

Interaktion zwischen osteoarthrotischen artikulären Knorpel-/subchondralen
Knochenexplantaten und humanen Chondrozyten/mesenchymalen Stammzellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ute Ingrid Mayer
aus
Alzenau i. UFr.

im Jahr
2018

Interaktion zwischen osteoarthrotischen artikulären Knorpel-/subchondralen
Knochenexplantaten und humanen Chondrozyten/mesenchymalen Stammzellen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ute Ingrid Mayer
aus
Alzenau i. UFr.

im Jahr
2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Betreuer:	Prof. Dr. Susanne Grässel
Tag der mündlichen Prüfung:	12.07.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osteoarthritis	1
1.2	Der artikuläre Knorpel	2
1.2.1	Aufbau und Funktion des artikulären Knorpels	2
1.2.2	Die Rolle des artikulären Knorpels in der Pathogenese der OA	6
1.3	Der subchondrale Knochen	8
1.3.1	Aufbau und Funktion des subchondralen Knochens	8
1.3.2	Die Rolle des subchondralen Knochens in der Pathogenese der OA	10
1.4	Knorpelregeneration	10
1.5	Mesenchymale Stammzellen	12
1.5.1	Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	14
1.5.1.1	Die Chondrogenese <i>in vivo</i>	14
1.5.1.2	Die Chondrogenese <i>in vitro</i>	15
1.5.2	Mesenchymale Stammzellen für die Knorpelregeneration	17
1.6	3D <i>in vitro</i> Kokulturmodelle	19
1.6.1	Indirekte Kokultur: Zellen als Micromass Pellets in konditioniertem Medium	20
1.6.2	Direkte Kokultur: Zellen in Fibringelen auf Explantaten	20
1.7	microRNAs	22
1.7.1	Biogenese und Funktion	22
1.7.2	Die Rolle von miRs während der Chondrogenese und in der Pathogenese der OA	24
1.7.3	Spezielle miRs und ihre potentiellen Zielgene	26
1.7.3.1	miR-675	26
1.7.3.2	miR-124a	27
1.7.3.3	miR-29b	28
2	Ziel der Arbeit	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Zellkultur	32
3.1.1	Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark	32
3.1.2	<i>Population doubling level</i> und Proliferationsrate humaner Knochenmarkstammzellen	33
3.1.3	Durchflusszytometrische Charakterisierung humaner Knochenmarkstammzellen anhand von Oberflächenmarkern	33
3.1.4	Isolierung und Kultivierung humaner artikulärer Chondrozyten	34
3.1.5	Generierung artikulärer Knorpel- und subchondraler Knochenexplantate	36
3.1.6	3D-Kokulturmodelle für die chondrogene Differenzierung	37
3.1.6.1	Direkte Kokultur: Zellen in Fibringelen auf Explantaten	37
3.1.6.2	Indirekte Kokultur: Micromass Pellets in konditioniertem Medium	39
3.1.7	Transiente Transfektion mit miR-29b-Mimic und miR-29b-Inhibitor	40
3.1.8	Inhibition und Stimulation der miR-29b-Expression	42
3.2	Molekularbiologie	42
3.2.1	RNA-Isolierung	42
3.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit	43
3.2.3	Überprüfung der RNA-Qualität	43

3.2.4	cDNA-Synthese	44
3.2.4.1	miRs.....	44
3.2.4.2	Potentielle Zielgene	45
3.2.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	46
3.2.5.1	miRs.....	47
3.2.5.2	Potentielle Zielgene	49
3.3	Proteinbiochemie	50
3.3.1	Proteinextraktion	50
3.3.1.1	Proteinextraktion aus Knorpelimplantaten	50
3.3.1.2	Proteinextraktion aus Zellen in Monolayer und Fibringen	52
3.3.1.3	Kollagenextraktion aus Zellkulturüberstand	52
3.3.2	BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.3.3	SDS-PAGE	53
3.3.3.1	Proteinextrakte aus Knorpelimplantaten	54
3.3.3.2	Proteinlysate aus Zellen in Monolayer und Fibringen.....	55
3.3.3.3	Kollagenextrakte aus Zellkulturüberstand	55
3.3.4	Western Blotting.....	55
3.3.5	Coomassie- und Silberfärbung	58
3.3.6	Gelatine-Zymographie	60
3.3.7	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i> (ELISAs)	61
3.3.7.1	Interleukin 8 (IL-8).....	62
3.3.7.2	<i>Connective tissue growth factor</i> (CTGF).....	62
3.3.7.3	Interferon gamma (IFN- γ)	62
3.3.8	Multiplex-Immunoassay	63
3.3.9	BrdU-Assay zur Messung der Zellproliferation.....	63
3.3.10	Caspase-3/7-Assay zur Messung der Apoptoserate.....	65
3.4	Statistische Analysen.....	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Charakterisierung humaner BMSC	67
4.1.1	<i>Population doubling level</i> und Proliferationsrate	67
4.1.2	Expression von Oberflächenmarkern auf BMSC	68
4.2	Einfluss von BMSC und Chondrozyten auf die Proteinexpression der kokultivierten Knorpelimplantate	70
4.3	Gegenseitige Beeinflussung der Proteinsekretion von Knorpelimplantaten und BMSC bei Kokultur.....	74
4.4	Einfluss von Knochen- / Knorpelimplantaten auf die Expression von miRs und potentiellen Zielgenen in kokultivierten BMSC und Chondrozyten.....	79
4.4.1	miR-675-, miR-301- und <i>COL2A1</i> -Genexpression.....	79
4.4.1.1	Kokultur mit OA-Knochenimplantaten	79
4.4.1.2	Kokultur mit OA-Knorpelimplantaten.....	81
4.4.1.3	Kokultur mit N-Knorpelimplantaten	83
4.4.2	miR-124a, SOX9 und CTGF Gen- und Proteinexpression.....	85
4.4.2.1	Kokultur mit OA-Knochenimplantaten	85
4.4.2.2	Kokultur mit OA-Knorpelimplantaten.....	85
4.4.2.3	Kokultur mit N-Knorpelimplantaten	91
4.4.3	miR-29b, <i>COL1A1</i> und <i>COL3A1</i> Gen- und Proteinexpression	93
4.4.3.1	Kokultur mit OA-Knochenimplantaten	93
4.4.3.2	Kokultur mit OA-Knorpelimplantaten.....	95
4.4.3.3	Kokultur mit N-Knorpelimplantaten	97

4.5	Einfluss der miR-29b auf die Expression der Kollagene I und III in chondrogen differenzierenden BMSC in einer OA-Umgebung	99
4.5.1	Lösliche, von OA-Knorpelimplantaten abgegebene Faktoren fördern die miR-29b-Expression in kokultivierten BMSC und hemmen die Kollagen I und III Genexpression und Proteinsekretion	99
4.5.2	miR-29b reguliert die <i>COL 1A1</i> und <i>COL3A1</i> mRNA- und Proteinsynthese	101
4.5.3	miR-29b fördert die Apoptose von BMSC, reguliert aber nicht deren Proliferation.....	103
4.5.4	Stimulation mit IFN- γ induziert die miR-29b-Expression	106
5	Diskussion.....	109
5.1	Einfluss von BMSC/Chondrozyten auf das kokultivierte Knorpelimplantat..	109
5.2	Gegenseitige Beeinflussung der Proteinsekretion von artikulärem Knorpelimplantat und BMSC bei Kokultur	112
5.3	Subchondrale Knochen- und artikuläre Knorpelimplantate beeinflussen die Expression von miRs und potentiellen Zielgenen in kokultivierten BMSC und Chondrozyten.....	116
5.4	miR-29b reguliert die Expression der Kollagene I und III in chondrogen differenzierenden BMSC in einer OA-Umgebung	122
6	Zusammenfassung	129
7	Summary	131
8	Anhang	133
I.	Abbildungsverzeichnis	133
II.	Tabellenverzeichnis	135
III.	Abkürzungsverzeichnis	137
IV.	Herstellerverzeichnis.....	143
9	Literaturverzeichnis.....	145
10	Danksagung	162
11	Lebenslauf	163
12	Selbstständigkeitserklärung	165

1 Einleitung

1.1 Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) ist eine multifaktorielle, degenerative Gelenkerkrankung und weltweit eine der häufigsten Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems (Woolf und Pfleger, 2003). Bei OA kommt es zu einem progressiven und irreversiblen Verlust von Gelenkknorpel, was mit der Schädigung angrenzender Strukturen wie Knochen, Synovialmembran der Gelenkkapsel, Bänder und Sehnen einhergeht (Loeser *et al.*, 2012). Am häufigsten betroffen sind Hand-, Knie- und Hüftgelenke (Litwic *et al.*, 2013), an denen OA zu Schmerzen und Bewegungseinschränkungen führt (Sinusas, 2012). Das Risiko OA zu entwickeln, steigt mit zunehmendem Alter. Während in Deutschland bei den unter 30-Jährigen nur jeder 20. an mindestens einem Gelenk OA aufweist, ist bei den über 60-Jährigen jeder zweite betroffen. Dabei ist das OA-Risiko bis 60 Jahre für Männer höher und kehrt sich erst in den höheren Altersgruppen zu Lasten der Frauen um (Schneider *et al.*, 2005). Neben Alter und Geschlecht zählen genetische Prädisposition, angeborene Fehlstellungen (X-/O-Beine) und Fehlbildungen (Hüft dysplasie), metabolische Faktoren wie Diabetes, schlechte, vitaminarme Ernährung, Übergewicht und dadurch resultierende Überbelastung der Gelenke oder Mikrotraumata und Sportverletzungen zu den weiteren Risikofaktoren (Musumeci *et al.*, 2015). OA lässt sich bisher nur symptomatisch behandeln (Sinusas, 2012). Durch Gewichtsreduktion können Gelenke entlastet und durch Physiotherapie der Bewegungsapparat gestärkt werden. Mit Fortschreiten der Erkrankung werden die Patienten mit Analgetika wie Paracetamol oder NSAIDs (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) wie Diclofenac, Ibuprofen oder Naproxen und COX-2-Inhibitoren (Cyclooxygenase-2) wie Celecoxib behandelt. Außerdem besteht die Möglichkeit, kurzzeitige Verbesserung durch intraartikuläre Injektionen von Hyaluronsäure zu erzielen. Oft führt OA in den großen, gewichtstragenden Hüft- und Kniegelenken aber letztlich zu künstlichem Gelenkersatz.

Die Pathogenese der OA ist ein komplexer, noch nicht vollständig aufgeklärter Prozess, an dem viele Faktoren und verschiedene Gewebe des gesamten Gelenks beteiligt sind (Man und Mologhianu, 2014). Die Rolle des Knorpels und Knochens im Pathomechanismus der OA wird in Abschnitt 1.2.2 bzw. 1.3.2 beschrieben.

1.2 Der artikuläre Knorpel

1.2.1 Aufbau und Funktion des artikulären Knorpels

Im menschlichen Körper lassen sich aufgrund unterschiedlicher Funktion, Vorkommen, Eigenschaften und Zusammensetzung (Zelldichte, Faserarten) drei verschiedene Knorpelarten unterscheiden: Faserknorpel, elastischer und hyaliner Knorpel (Cole, 2011). Der elastische Knorpel, wie z.B. in der Ohrmuschel, ist das zellreichste Knorpelgewebe und besitzt neben Kollagenen ein dichtes, elastisches Fasernetz aus Elastin. Dies verleiht ihm eine hohe Biegefestigkeit und Dehnbarkeit, jedoch wenig Druckfestigkeit. Faserknorpel wie beispielsweise in den Bandscheiben und Menisken ist die zellärmste Knorpelart. Er besteht größtenteils aus Kollagen-I-Fasern, wodurch er eine hohe Zugfestigkeit erhält. Der hyaline Knorpel kommt u.a. als Gelenk-, Rippen- sowie Nasenknorpel vor und ist das am häufigsten vorkommende Knorpelgewebe im Körper. Er besitzt eine niedrige Zugfestigkeit, aber eine hohe Druckelastizität (Wachsmuth *et al.*, 2006).

Ein Subtyp des hyalinen Knorpels ist der artikuläre Knorpel, der an Gelenken die Enden der Knochen überzieht. Die glatte Oberfläche des Gelenkknorpels sorgt für ein reibungsarmes Gleiten der Gelenkoberflächen bei Bewegung. Durch seine hohe Druckelastizität und Kompressionsfähigkeit trägt der artikuläre Knorpel zur Stoßdämpfung bei und minimiert somit hohe Druckspitzen auf den subchondralen Knochen (Poole *et al.*, 2001).

Artikuläres Knorpelgewebe besteht, wie alle Knorpelarten, aus einer dichten extrazellulären Matrix (ECM), in die relativ wenige, hoch spezialisierte Knorpelzellen, die sog. Chondrozyten, eingelagert sind (Buckwalter *et al.*, 1994). Hauptbestandteil der ECM ist Wasser (80 % vom Nassgewicht), das in einem komplizierten Netzwerk aus Kollagenen (60 % vom Trockengewicht), Proteoglykanen und Glykoproteinen (40 % vom Trockengewicht), die von den Chondrozyten (1 % vom Knorpelvolumen) synthetisiert werden, gebunden ist (Buckwalter *et al.*, 2005).

Der Gelenkknorpel ist nicht von Blutgefäßen durchzogen, sondern die Chondrozyten werden durch die Gelenkflüssigkeit, die Synovialflüssigkeit, versorgt. Durch den Wechsel von Be- und Entlastung des Knorpels während der Gelenkbewegung gelangen über Diffusion Sauerstoff und Nährstoffe zu den Zellen und Abfallstoffe werden ausgeschwemmt (Jackson und Gu, 2009). Das Fehlen von Nerven und Blutgefäßen im Knorpelgewebe ist von Vorteil, um den starken Belastungen im

Gelenk ohne Verletzungen standzuhalten. Blutgefäße würden bei Belastung abgedrückt und Nerven würden einen Schmerzreiz weiterleiten. Die geringe Zelldichte und das Fehlen einer direkten Nerven- und Blutversorgung tragen jedoch zu dem geringen Selbstheilungsvermögen und der dürftigen Regenerationsfähigkeit nach Verletzungen oder krankheitsbedingtem Knorpelverlust bei (Abschn. 1.4, S. 10).

Im Querschnitt durch normalen hyalinen Gelenkknorpel lassen sich verschiedene Zonen erkennen (Abb. 1). Direkt unter der Knorpeloberfläche beginnt die Tangentialzone (STZ: *superficial tangential zone*), die 10 - 20 % der Knorpeldicke ausmacht. In diesem Bereich sind die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche angeordnet. Die Chondrozyten weisen einen abgeplatteten, spindelförmigen Phänotyp auf und produzieren eine Matrix mit einem hohen Kollagen- und niedrigen Proteoglykangehalt. In dieser Schicht ist die Wasserkonzentration am höchsten. Die Chondrozyten in der mittleren Zone (40 - 60 % der Knorpeldicke) sind ovale bis runde einzeln liegende Zellen, die in tieferen Schichten in Säulen angeordnet sind. Die mittlere Zone des hyalinen Knorpels besitzt schräg verlaufende Kollagenfibrillen mit größerem Durchmesser und eine höhere Proteoglykankonzentration. Die tiefe Zone (30 - 40 % der Knorpeldicke) weist abgerundete, in Säulen angeordnete Zellen auf. Die in dieser Schicht senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfasern mit dem größten Durchmesser reichen bis in den Grenzstreifen. Diese sog. "tidemark" trennt den nicht-kalzifizierten vom kalzifizierten Knorpel, an den sich der subchondrale Knochen anschließt (Sophia Fox *et al.*, 2009).

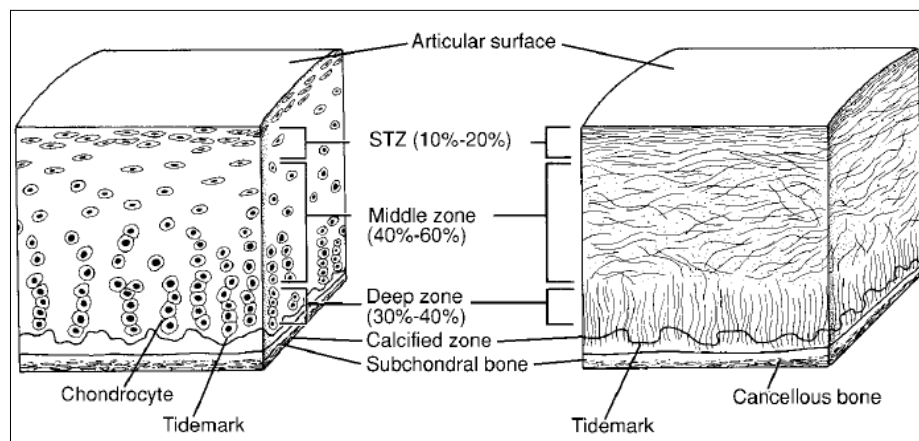


Abb. 1 Aufbau des artikulären Knorpels

Der Grenzstreifen (*tidemark*) trennt den nicht-kalzifizierten vom kalzifizierten Knorpel, der sich an den subchondralen Knochen anschließt. Der nicht-kalzifizierte Knorpel lässt sich in drei Zonen einteilen: die Tangentialzone (STZ: *superficial tangential zone*) mit abgeplatteten Chondrozyten und parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfasern, die mittlere Zone mit schräg verlaufenden Kollagenfibrillen und die tiefe Zone, in der runde Chondrozyten in Säulen angeordnet sind und die Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche verlaufen. (Abbildung aus **Buckwalter *et al.*, 1994**)

Die ECM, bestehend aus Gewebsflüssigkeit und einem Gerüst aus strukturgebenden Makromolekülen wie Proteoglykanen und Kollagenen, wird unterteilt in perizelluläre, territoriale und interterritoriale Regionen. Die perizelluläre Matrix schließt sich direkt an die Zellmembran an, besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen und umgibt den Chondrozyten komplett. Die perizelluläre Matrix geht in die territoriale Matrix über, die aus dünnen Kollagenfibrillen besteht und die Chondrozyten vor mechanischem Stress schützt. Die interterritoriale Matrix macht den größten Anteil im artikulären Knorpel aus und trägt am meisten zu den speziellen biomechanischen Eigenschaften bei (Sophia Fox *et al.*, 2009). Das Wasser der Gewebsflüssigkeit enthält Gase, kleine Proteine, Metaboliten und eine hohe Kationenkonzentration, um die negative Ladung der Proteoglykane auszugleichen (Buckwalter und Mankin, 1997).

Bei den Proteoglykanen im Knorpel macht Aggrecan den größten Teil aus. Aggrecan ist über Linkprotein mit Hyaluronsäure assoziiert und hat Glykosaminoglykanseitenketten (GAGs), bestehend aus Keratansulfat oder Chondroitinsulfat, gebunden. Außerdem enthält der artikuläre Knorpel noch eine Vielzahl sog. *small leucine-rich repeat proteoglycans* (SLRPs) wie Decorin, Bicycan, Fibromodulin oder Lumican, die zur Integrität des Gewebes beitragen (Roughley, 2006). Proteoglykane halten den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des artikulären Knorpels aufrecht, denn durch ihre negativ geladenen Sulfat- und Carboxylatgruppen ziehen sie positiv geladene Ionen an und stoßen negativ geladene Ionen wie Chlorit ab. Dadurch erhöht sich die Konzentration anorganischer Ionen wie Natrium innerhalb der Matrix, wodurch die Osmolarität des Knorpels steigt. Dies führt zur Bindung großer Mengen an Flüssigkeit. Ein Netzwerk aus Kollagenen wirkt dem osmotischen Druck entgegen (Buckwalter und Mankin, 1997).

Bei 95 % der im artikulären Knorpel vorkommenden Kollagenen handelt es sich um Kollagen II. Andere Kollagene wie I, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII, XIV werden als Minoritäten-Kollagene bezeichnet und tragen nur zu einem kleinen Teil zur ECM bei (Buckwalter *et al.*, 2005; Eyre, 2002; Sophia Fox *et al.*, 2009). Ein charakteristisches Merkmal von Kollagenen ist ihre Struktur: sie bestehen aus drei α -Helices, die sich zu einer Tripelhelix winden. Die α -Polypeptidketten enthalten sich wiederholende Einheiten des Aminosäuretriplets Glycin-X-Y, wobei an der X- und Y-Position häufig Prolin bzw. 4-Hydroxyprolin vorkommt. Die Tripelhelix kann als Homo- oder Heterotrimer vorkommen (Tab. 1), d.h. aus drei identischen oder unterschiedlichen α -Ketten bestehen, die von zwei oder drei verschiedenen Genen kodiert werden (Ricard-Blum, 2011).

Die Tripelhelix, auch Tropokollagen genannt, hat einen Durchmesser von 1,5 nm und am N- und C-Terminus nicht-helikale Domänen, sog. *non-collagenous domains*, NC-Domänen. Man unterscheidet verschiedene Arten von Kollagenen: fibrilläre (z.B. I, II, III, V), netzbildende (z.B. IV, VIII, X) oder fibrillenassoziierte Kollagene (FACIT-Kollagene, z.B. IX, XII, XIV, XVI). Zudem gibt es auch Kollagene mit Transmembrandomänen (z.B. XIII, XVII) (Kadler *et al.*, 2007; Ricard-Blum, 2011).

Tab. 1 Zusammensetzung ausgewählter fibrillärer Kollagentripelhelices

Kollagen	Zusammensetzung der Tripelhelix	Gene für die α -Ketten
Typ I	zwei $\alpha 1(I)$, eine $\alpha 2(I)$ Kette	<i>COL1A1, COL1A2</i>
Typ II	drei $\alpha 1(II)$ Ketten	<i>COL2A1</i>
Typ III	drei $\alpha 1(III)$ Ketten	<i>COL3A1</i>

Fibrillen-bildende Kollagene werden als Prokollagene synthetisiert, mit N- und C-terminalem Propeptid am entsprechenden Ende der tripelhelikalen Domäne, die für die Fibrillogenese extrazellulär abgespalten werden. Während der Synthese der einzelnen α -Ketten bleiben die C-terminalen Propeptide von drei pro- α -Ketten im endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert, wodurch die Bildung der Tripelhelix gestartet wird. Als post-transkriptionale Modifikationen treten Hydroxilierung von Prolin- und Lysinresten auf und Hydroxyprolin kann anschließend noch glykosyliert werden. Extrazellulär kommt es zur Abspaltung der C- und N-terminalen Propeptide und die Monomere ordnen sich zu Fibrillen an, die durch kovalente Verbindungen, katalysiert durch die Lysyloxidase, zusammengehalten werden. Die Kollagentripelhelix ist sehr resistent gegen proteolytische Spaltung durch Pepsin, Trypsin und Papain. Am Abbau von Kollagenen sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Cystein- und Serinproteinasen beteiligt (Kadler *et al.*, 2007). Beeindruckend ist, dass Kollagenmoleküle im artikulären Knorpel eine außergewöhnlich lange Halbwertszeit von über 100 Jahren haben (Maroudas *et al.*, 1992).

Chondrozyten sind die einzige in Knorpel vorkommende Zellart und hochspezialisiert. Sie synthetisieren alle Matrixkomponenten und regulieren den Matrixmetabolismus, indem sie Matrix-degradierende Enzyme sezernieren. Charakteristisch für Chondrozyten ist außerdem ihre spheroidale Form, dass sie keine Zell-Zell-Kontakte ausbilden, in einer Umgebung mit sehr geringer Sauerstoffkonzentration überleben und über die Synovialflüssigkeit durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden.

Chondrozyten können eine hohe metabolische Aktivität aufweisen, auch wenn Knorpelgewebe als metabolisch eher inaktiv gilt. Dies liegt an der geringen Zelldichte (Bhosale und Richardson, 2008).

1.2.2 Die Rolle des artikulären Knorpels in der Pathogenese der OA

OA ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Ursache noch nicht eindeutig geklärt ist. Allerdings wird dem artikulären Knorpel und speziell den Chondrozyten eine zentrale Rolle zugesprochen, denn das am besten charakterisierte Merkmal der OA ist der progressive, irreversible Verlust der Knorpelmatrix. Die Degradation wird durch ein gestörtes Gleichgewicht des Knorpelmetabolismus bedingt, das zugunsten kataboler Prozesse verschoben ist. Degradative Veränderungen des artikulären Knorpels kommen durch ein komplexes Zusammenspiel mechanischer, biochemischer und metabolischer Mechanismen zu Stande.

Eine mechanische Überbelastung des normalen Knorpels oder eine normale, physiologische Belastung von vorgeschädigtem Knorpel kann die Chondrozytenfunktion und dadurch die Knorpelstruktur beeinflussen und zur Manifestation einer OA beitragen. Chondrozyten, die zellulären Mediatoren in der Pathogenese der OA, reagieren auf direkte biomechanische Störungen mit einer Hochregulation der synthetischen Aktivität oder mit einer erhöhten Produktion inflammatorischer Zytokine (Goldring und Goldring, 2007). Die frühesten Veränderungen des Knorpels treten an der Gelenkoberfläche in den Bereichen auf, an denen mechanische Scherkräfte wirken (Andriacchi *et al.*, 2004). Da bei gerader Beinachse das mediale Kniegelenkkompartiment immer mehr belastet wird als das laterale, manifestiert sich die Gonarthrose häufiger medial als lateral (Matziolis und Rohner, 2015; Vincent *et al.*, 2012). In der frühen OA-Phase werden Chondrozyten aktiv und proliferieren, bilden Cluster und steigern die Produktion sowohl von Matrixproteinen als auch von Matrix-abbauenden Enzymen. Die proteolytische Degradation der Knorpelmatrix im Verlauf der OA betrifft v.a. Kollagen II, das Hauptsubstrat der Matrixmetalloproteinase 13 (MMP-13), und Aggrecan, das v.a. durch Aggrecanasen aus der ADAMTS-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) abgebaut wird (Goldring, 2012). Mechanische Belastungsexperimente *in vitro* haben gezeigt, dass eine statische Kompression den Abbau von Proteoglykanen fördert, das Kollagennetzwerk schädigt und die Synthese von Matrixproteinen hemmt. Eine dynamische Kompression hingegen steigert die Matrixsyntheseaktivität der

Chondrozyten (Guilak *et al.*, 2004). Mechanischer Stress, ausgelöst z.B. durch ein Trauma, aktiviert neben der Expression von Knorpel-abbauenden Proteinasen und Stressfaktoren auch inflammatorische Mediatoren (Lee *et al.*, 2005). IL-1 (Interleukin-1) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) sind kritische pro-inflammatorische, katabole Zytokine, die an der Initiation und Progression der OA beteiligt sind (Goldring, 2000). Durch die veränderte Matrixstruktur kommt es zu einer Zunahme des Wassergehalts im hyalinen Knorpel. Dies beeinflusst die Elastizität und Steifigkeit und trägt somit zur reduzierten Belastungsfähigkeit des Knorpels bei (Bhosale und Richardson, 2008). Außerdem kommt es zur "Fibrillierung", wodurch die Knorpeloberfläche zunächst aufgeraut wird. Mit der Progression der Matrixdegeneration bilden sich dann tiefe Risse und die Knorpelerosion schreitet fort (Adatia *et al.*, 2012).

Es gibt verschiedene Systeme, um Grad und Stadium der OA-Erkrankung zu bestimmen, z.B. radiologisch, makroskopisch oder histologisch. Für die radiologische Einteilung nach Kellgren und Lawrence (Kellgren und Lawrence, 1957) werden Veränderungen wie Verschmälerung des Gelenkspalts, Sklerose des subchondralen Knochens, Deformation und Bildung von Osteophyten als Kriterien herangezogen und Punkte von 1 bis 10 vergeben. Anhand der Punktzahl ergibt sich der jeweilige Grad (0-4). Allerdings ist die Korrelation zwischen radiologischem Stadium und den klinischen Beschwerden schlecht. Hannan *et al.* fanden einerseits heraus, dass nur 47 % der Patienten mit radiologischen Anzeichen einer OA (Grad 2-4) Knieschmerzen hatten. Andererseits wiesen nur 15 % der Patienten mit Knieschmerzen radiologische OA-Veränderung des Grades 2-4 auf (Hannan *et al.*, 2000). Ein histologisches Graduierungssystem ist der sog. Mankin-Score mit einer Maximalpunktzahl von 14, bei dem folgende Parameter berücksichtigt werden: Struktur des Knorpels (0-5 Punkte), Zellularität (0-3 Punkte), Proteoglykangehalt bzw. -verlust (0-5 Punkte) und die Integrität der Tidemark (0-1 Punkt) (Mankin *et al.*, 1971). Auch die *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) hat ein eigenes Grading- bzw. Staging-System, das primär für wissenschaftliche Studien genutzt wird (Pritzker *et al.*, 2006). In Deutschland ist die Stadieneinteilung nach Otte (Otte, 1969) am häufigsten (Soder und Aigner, 2011). Normaler Knorpel (Stadium 0) besitzt eine glänzend weißliche Oberfläche (Abb. 2a). Durch oberflächliche Fibrillierung verliert der Knorpel seinen Glanz und verfärbt sich gelblich (Stadium I, Abb. 2b). Es tritt jedoch noch kein Substanzverlust auf. In Stadium II liegt ein Knorpeldefekt vor, der nicht die gesamte Dicke des Knorpels umfasst und bei dem Rissbildung und

Fibrillierung den subchondralen Knochen nicht erreichen (Abb. 2c). Wenn der Knorpeldefekt bis zum subchondralen Knochen reicht, handelt es sich um Stadium III (Abb. 2d). Im Endstadium (IV) liegt zumindest fokal ein totaler Knorpelverlust vor. Dadurch liegt der subchondrale Knochen frei (Abb. 2e) und Deformierungen der Gelenkfläche und Schliiffspuren können auftreten, wenn Knochen auf Knochen reibt.

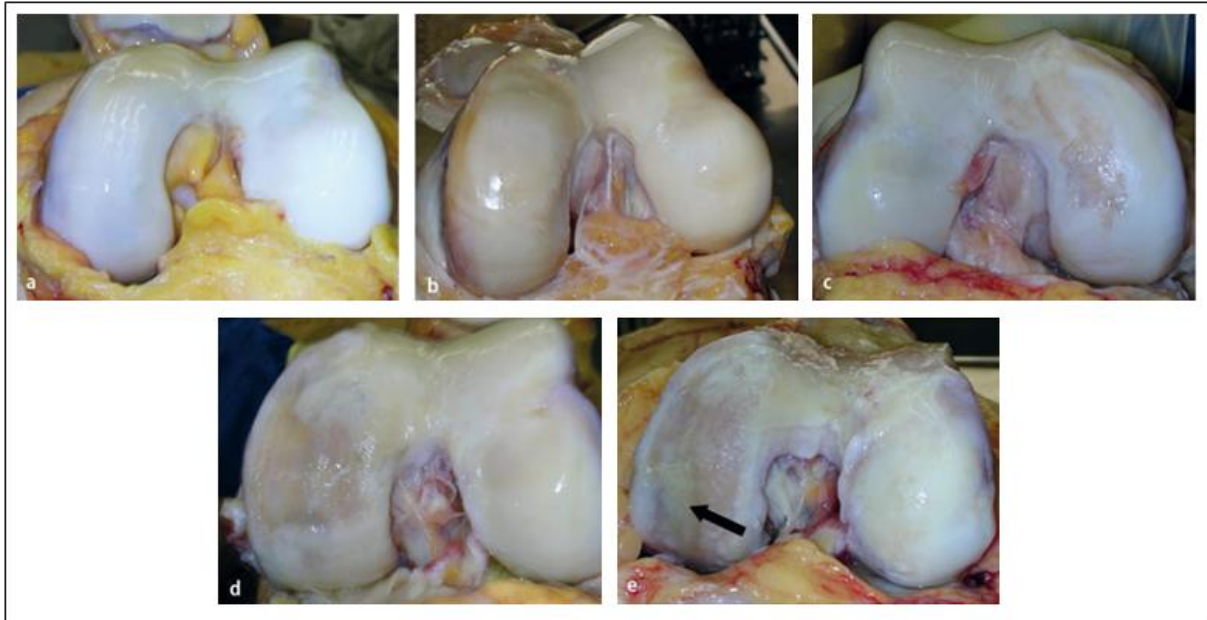


Abb. 2 Beispiele für die verschiedenen OA-Stadien am Kniegelenk nach Otte

(a) Stadium 0: normaler, spiegelnder Knorpel ohne Verfärbungen; (b) Stadium I: Knorpeloberfläche verfärbt und stumpf; (c) Stadium II: Läsionen mit oberflächlichen Fibrillierungen; (d) Stadium III: Läsionen mit tiefen Fibrillierungen/Erosionen; (e) Stadium IV: ausgedehnt freiliegende Knochenoberfläche (Pfeil). (Abbildung aus **Soder und Aigner, 2011**)

1.3 Der subchondrale Knochen

1.3.1 Aufbau und Funktion des subchondralen Knochens

Das menschliche Skelett besteht aus über 200 Knochen, die Teil des Stütz- und Bewegungsapparates sind. Knochen sind im Gegensatz zum Knorpel innerviert sowie vaskularisiert und es kommen verschiedene Zelltypen vor wie Osteoblasten, Osteoklasten und mesenchymale sowie hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark. Anhand von Unterschieden in der Mikrostruktur unterscheidet man grundsätzlich zwei Arten von Knochengewebe: kortikaler und trabekulärer Knochen. Kortikaler Knochen besteht aus einem dichten, kompakten Knochengewebe, das man in Röhrenknochen findet. An den Enden der Röhrenknochen kommt der schwammartige, trabekuläre Knochen (Spongiosa) vor, der aus einem Netzwerk aus dünnen Platten und verbundenen Kanälen umgeben von Knochenmark besteht.

Die Bildung der Knochenmatrix und deren Mineralisierung wird von Osteoblasten vermittelt, wohingegen Osteoklasten für die Resorption zuständig sind. Das Osteoid, die Knochenmatrix vor der Mineralisierung, besteht zu 90 % aus Kollagen I. Weitere Bestandteile sind Glykoproteine, Proteoglykane und Enzyme für die Mineralisierung wie die alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin. 50 - 70 % der reifen Knochenmasse besteht aus Mineralien, v.a. Kalzium und Phosphor, die das Hydroxyapatit bilden, ein kristallines, hydratisiertes Kalziumphosphat (Grabowski, 2015).

Als subchondraler Knochen wird allgemein der Knochen unterhalb des Knorpels bezeichnet, der durch die Zementlinie vom kalzifizierten Knorpel abgegrenzt wird. Er lässt sich in die subchondrale Knochenplatte, die dünner als normaler kortikaler Knochen ist, und den subchondralen trabekulären Knochen (subartikuläre Spongiosa) unterteilen (Abb. 3) (Li *et al.*, 2013). Blutgefäße reichen über Kanäle in der subchondralen Knochenplatte bis in den kalzifizierten Knorpel. Neben der Versorgung des artikulären Knorpels besteht eine weitere Funktion des subchondralen Knochens darin, die bei Belastung auftretende Kraft abzuleiten, um mechanischen Stress zu vermeiden (Madry *et al.*, 2010).

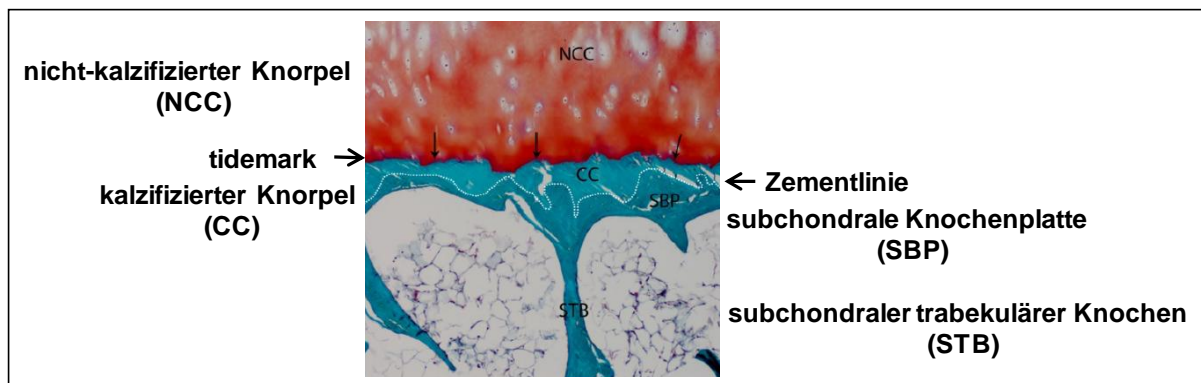


Abb. 3 Aufbau des subchondralen Knochens

Die subchondrale Knochenplatte (SBP: *subchondral bone plate*) wird durch die Zementlinie vom darüberliegenden kalzifizierten Knorpel (CC: *calcified cartilage*) getrennt. Der Übergang in den schwammartigen subchondralen trabekulären Knochen (STB: *subchondral trabecular bone*) ist hingegen fließend. (Abbildung aus Li *et al.*, 2013)

1.3.2 Die Rolle des subchondralen Knochens in der Pathogenese der OA

OA galt lange Zeit ausschließlich als degenerative Knorpelerkrankung, doch es sind alle Gelenkstrukturen betroffen (Loeser *et al.*, 2012; Man und Mologhianu, 2014). Auch der subchondrale Knochen spielt eine Rolle im Verlauf der OA, wobei noch nicht geklärt ist, ob die Veränderungen im Knochen Auslöser oder Folge der Knorpel-degeneration sind. Zell-vermittelte Prozesse des Remodelings führen bei OA zu strukturellen Änderungen der subchondralen Knochenarchitektur und modifizieren die biomechanischen Eigenschaften. In der Knochenhomöostase sind Osteoklasten für die Resorption zuständig und Osteoblasten für die Matrixbildung und Mineralisierung. Ein gestörtes Gleichgewicht im Knochenmetabolismus führt zu den bei der OA beobachteten Veränderungen des subchondralen Knochens: progressive Zunahme der Dicke der subchondralen Knochenplatte (Sklerosierung), Osteophytenbildung an den Gelenkrändern und Zystenbildung im subchondralen Knochen (Goldring und Goldring, 2010).

1.4 Knorpelregeneration

Adulte artikuläre Knorpel besitzt nur geringes Selbstheilungsvermögen und dürftige Regenerationsfähigkeit (Hunziker, 1999). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Knorpel nicht innerviert und nicht vaskularisiert ist und die Chondrozyten, die nur in geringer Zelldichte vorliegen, in einer dichten Matrix eingeschlossen sind (Tallheden *et al.*, 2006). Allerdings findet sich auch im adulten Knorpel eine kleine Population von Stammzellen/Chondroprogenitor-Zellen (*cartilage-derived stem cells*, *CSC*/*cartilage progenitor cells*, *CPC*) mit ähnlichen Eigenschaften wie mesenchymale Progenitorzellen (MPC) (Fickert *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Diese Zellen migrieren und reagieren auf Verletzungen (Seol *et al.*, 2012). Ihre Funktion und Rolle bei der OA ist jedoch noch nicht gut charakterisiert (Jiang und Tuan, 2015).

OA kann bisher nicht ursächlich behandelt werden, lediglich die Symptome können gelindert werden und für betroffene Knie- und Hüftgelenke besteht die Möglichkeit eines künstlichen Gelenkersatzes. Für die Behandlung lokal begrenzter Knorpeldefekte z.B. nach Trauma gibt es mehrere Therapieverfahren. Bei sog. chondralen Defekten ist nur der Knorpel betroffen, wohingegen bei osteochondralen Defekten auch der subchondrale Knochen Schaden genommen hat.

Eine Möglichkeit ist die autologe osteochondrale Knorpel-Knochen transplantation, auch Mosaikplastik genannt. Hierfür werden hyaline Knorpel-Knochenzylinder aus unbelasteten Kniegelenksbereichen gewonnen und in eine Defektzone mit tiefem Knorpelschaden und ggf. auch eines Defektes des subchondralen Knochens eingesetzt (Bös und Ellermann, 2003). Wegen der begrenzten Verfügbarkeit autologer Spenderzylinder und der Gefahr der Donormorbidität an der Entnahmestelle werden auch osteochondrale Allografts transplantiert (Torrie *et al.*, 2015). Doch auch hierbei können Probleme auftreten: zu wenig Organspender, mangelnde Integration ins Empfängergerewebe, Verlust der Zellvitalität durch die Lagerung nach Entnahme aus dem Spender bis zum Einsetzen in den Empfänger und die Gefahr der Übertragung von Krankheiten.

Eine weitere Möglichkeit ist die Knochenmarkstimulation durch Mikrofrakturierung, die Anfang der 1980er entwickelt wurde. Dabei wird der subchondrale Knochen angebohrt, um durch Einbluten das Einwandern von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSC) in den Knorpeldefekt zu ermöglichen. Bei dem durch BMSC gebildeten Reparaturgerewebe handelt es sich jedoch meistens um minderwertigen Faserknorpel, mit schlechteren biochemischen und biomechanischen Eigenschaften als der ursprüngliche hyaline artikuläre Knorpel (Steadman *et al.*, 2010).

Anwendung findet auch die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), im Englischen oft ACI genannt (*autologous chondrocyte implantation*). Diese in Kaninchen entwickelte Methode wurde 1984 von Peterson *et al.* auf dem Jahrestreffen der *Orthopedic Research Society* in Atlanta vorgestellt und gilt als die erste Anwendung von Tissue Engineering in der Orthopädie. 10 Jahre später wurden die ersten Ergebnisse der Anwendung dieser Zell-basierten Therapie im Menschen publiziert (Brittberg *et al.*, 1994) und seither stetig weiterentwickelt. Neuere Methoden beinhalten Scaffolds oder Wachstumsfaktoren und werden daher als Tissue Engineering-Technik betrachtet. Für die klassische ACT wird bei einer ersten Operation aus einem wenig belasteten Bereich des betroffenen Gelenks eine Knorpelprobe entnommen, die Chondrozyten isoliert und *in vitro* expandiert. Nach zwei bis drei Wochen findet eine zweite Operation statt. Dabei wird der Knorpeldefekt wasserdicht verschlossen, indem ein Periostallappen, ein Stück Knochenhaut, am umliegenden Knorpel vernäht wird. In den so verschlossenen Knorpeldefekt wird dann die Zellsuspension injiziert (Brittberg *et al.*, 1994). Da es jedoch bei

Verwendung eines Knochenhautlappens zum Verschließen des Defekts häufig zur Hypertrophie des Periostallappens, also einem Überwuchern, kommt (Peterson *et al.*, 2000), wurde stattdessen als Alternative zunächst eine porcine Kollagenmembran verwendet. Daraus entwickelte sich schließlich die sog. Matrix-induzierte autologe Chondrozytenimplantation (MACI), bei der artifizielle Matrices verwendet werden. Die Chondrozyten werden eine gewisse Zeit vor dem Implantieren auf der Membran ausgesät und *in vitro* weiterkultiviert, bevor die Membran passgenau zugeschnitten und mit Fibrinkleber an den Rändern des Knorpeldefekts fixiert wird. Als Matrix werden neben Kollagen-I/III-Membranen auch Hyaluronsäure- oder Fibrin-Scaffolds verwendet (Makris *et al.*, 2015).

Eine zellfreie Methode, für die nur eine Operation (einzeitige Methode) notwendig ist, ist die autologe Matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC). Hierbei wird zunächst eine Mikrofrakturierung durchgeführt und anschließend eine Kollagenmatrix mittels Fibrinkleber auf dem Defekt fixiert. Dadurch wird das aus dem subchondralen Knochen austretende Blut-Zell-Gemisch im Defektbereich zurückgehalten, wo sich das Reparaturgewebe bilden soll (Benthien und Behrens, 2011).

1.5 Mesenchymale Stammzellen

Chondrozyten stehen für Zell-basierte Knorpelregenerationstherapien nur begrenzt zur Verfügung. Wegen der Gefahr der Donormorbidität können nur kleine Stückchen intakten Knorpels entnommen werden, andererseits dedifferenzieren Chondrozyten aber bei der *in vitro*-Expansion. Deshalb gibt es Bestrebungen adulte mesenchymale Stammzellen z.B. aus dem Knochenmark oder Fettgewebe anstatt ausdifferenzierter Knorpelzellen zu verwenden.

Stammzellen zeichnen sich allgemein dadurch aus, dass aus ihnen Tochterzellen, die den Stammzellcharakter beibehalten, und Zellen verschiedener Differenzierungslinien hervorgehen können. Man unterscheidet pluripotente embryonale Stammzellen, die in der inneren Zellmasse der Blastozyste vorkommen und in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) differenzieren können, von multipotenten adulten Stammzellen. Diese kommen in verschiedenen Organen und Geweben im Körper vor, besitzen aber nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential. Neben hämatopoetischen Stammzellen (HSC), aus denen sich die Zellen des Blutsystems entwickeln, finden sich im adulten Körper auch mesenchymale Stammzellen (MSC), Vorläuferzellen für Stütz- und Bindegewebe wie

Knochen, Knorpel, Muskeln, Bänder, Sehnen und Fettgewebe (Abb. 4). MSC wurden erstmals 1968 von Friedenstein als adhärente, Fibroblasten-ähnliche Zellen einer Population des Knochenmarks beschrieben, die in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenzieren können (Friedenstein *et al.*, 1968). Caplan prägte den Begriff "mesenchymale Stammzelle" (Caplan, 1991). Pittenger und Kollegen zeigten die hohe Proliferationsrate von MSC auf und wiesen das multipotente Differenzierungspotential adulter humaner MSC nach (Pittenger *et al.*, 1999). Neben dem chondrogenen Differenzierungspotential und der hohen Proliferationsfähigkeit zeichnen sich MSC auch dadurch aus, dass sie – im Gegensatz zu Chondrozyten – über mehrere Passagen *in vitro* expandiert werden können, ohne ihre multipotenten Eigenschaften zu verlieren. Darum bieten sie sich als mögliche Alternative zu Chondrozyten für Zell-basierte Knorpelregenerationstherapien an.

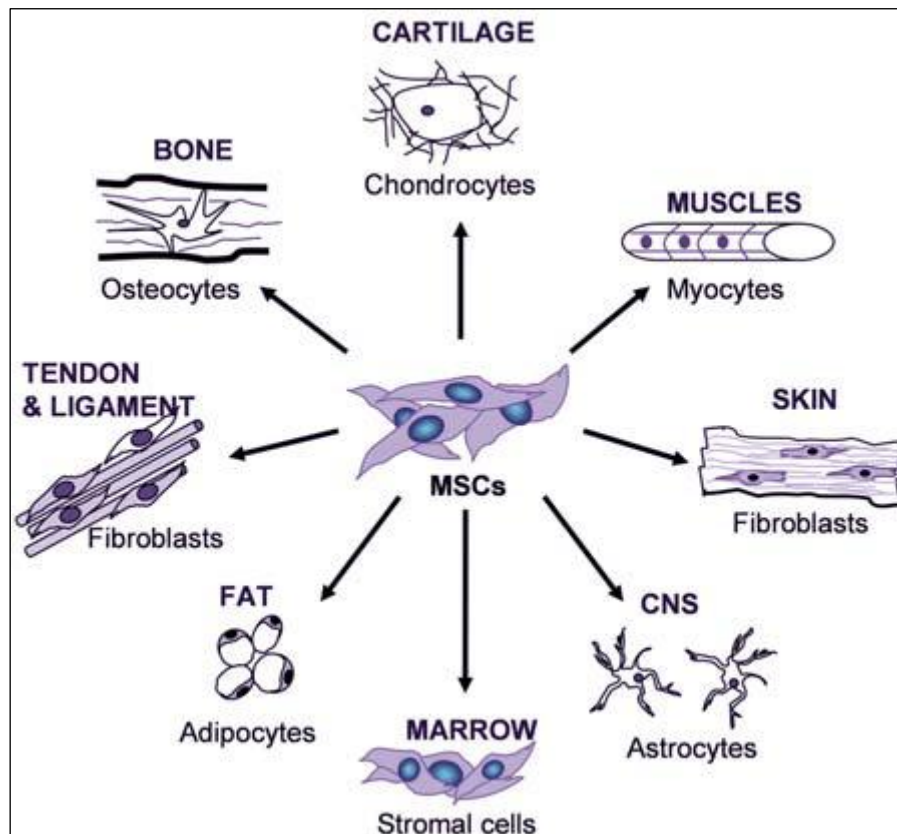


Abb. 4 Differenzierungspotential adulter mesenchymaler Stammzellen (MSC)

MSC können in verschiedene Zelltypen mesenchymaler Gewebe differenzieren wie z.B. Osteozyten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Astrozyten oder Myozyten.

(Abbildung aus Grässel und Ahmed, 2007)

1.5.1 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Durch das Anschalten spezieller genetischer Programme wird bestimmt, zu welchem Zelltyp sich MSC differenzieren. Den Ablauf der chondrogenen Differenzierung während der Embryonalentwicklung zur Entstehung von Knorpel bezeichnet man als Chondrogenese. Dieser Begriff wird auch für die chondrogene Differenzierung von MSC *in vitro* verwendet.

1.5.1.1 Die Chondrogenese *in vivo*

Während der Chondrogenese in der Embryogenese, der frühesten Phase der Skelettentwicklung, schlagen multipotente MSC die chondrogene Differenzierungsline ein, was über folgende Schritte zur Bildung von Knorpel und Knochen führt: Rekrutierung und Kondensation von MSC, Chondrozytendifferenzierung und -reifung, Bildung von Knorpel und durch enchondrale Ossifikation von Knochen. Die einzelnen Phasen der Chondrogenese werden durch Zell-Matrix-Interaktionen sowie durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reguliert, die zeitlich und räumlich begrenzt bestimmte Signalwege an- oder abschalten. Dadurch wird die Expression spezieller Gene kontrolliert (Abb. 5). Die Entwicklung der Röhrenknochen und Gelenke bei Vertebraten wird vor allem durch den FGF- (*fibroblast growth factor*), BMP- (*bone morphogenetic protein*) und Hedgehog-Pathway reguliert. Während der Kondensation von undifferenzierten MSC wird durch TGF- β (*transforming growth factor beta*) und verschiedene BMPs die Expression von Sox9, des Mastertranskriptionsfaktors der chondrogenen Differenzierung, induziert. Prächondrozytische MSC produzieren eine ECM, die reich an Hyaluronsäure sowie Kollagen I und IIA ist. Mit Beginn der Kondensation steigt die Aktivität der Hyaluronidase und Zelladhäsionsmoleküle wie N-Cadherin werden exprimiert. TGF- β stimuliert außerdem die Synthese von Fibronectin. Die Differenzierung von Chondroprogenitorzellen ist durch die Bildung einer Knorpelmatrix charakterisiert, die Kollagen II, IX, XI und Aggrecan enthält, deren Expression durch Sox9 und dessen Ko-Transkriptionsfaktoren L-Sox5 und Sox6 reguliert wird. Die Expression der Sox-Proteine (*SRY-related [sex determining region of Y gene] HMG [high-mobility group] box*) ist vom BMP-Signaling abhängig. Ihh (*indian hedgehog*) wird von prehypertrophen Chondrozyten produziert, wenn sie von der proliferativen in die hypertrophe Phase übergehen und beginnen den hypertrophen Chondrozytenmarker Kollagen X und alkalische Phosphatase (ALP) zu exprimieren. Der Transkriptions-

faktor Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) wirkt als positiver regulatorischer Faktor während der Chondrozytenreifung. Für die Bildung von Knochen durch enchondrale Ossifikation durchlaufen Chondrozyten die sog. terminale Differenzierung hin zu einem hypertrophen Phänotyp bevor einige durch Apoptose sterben und es zur Mineralisierung/Kalzifizierung der Knorpelmatrix, Vaskularisierung und Ossifikation kommt (Goldring *et al.*, 2006). Einige hypertrophe Chondrozyten überleben die terminale Differenzierung jedoch. Sie transdifferenzieren zu Osteoblasten und tragen auf diese Weise zur enchondralen Knochenbildung bei (Park *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2014).

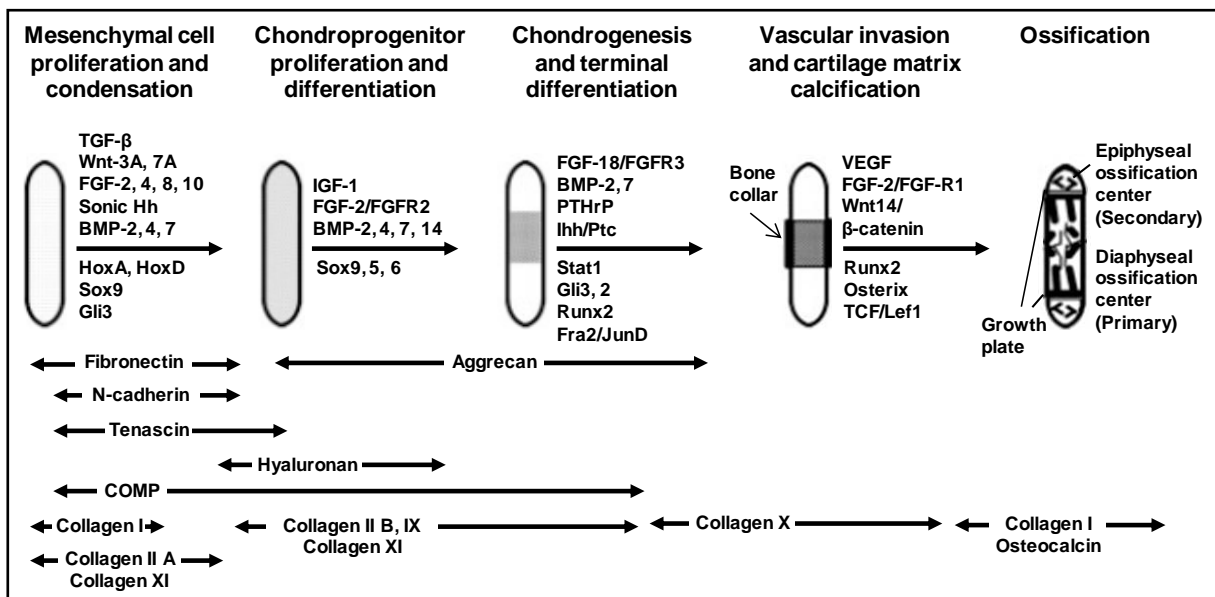


Abb. 5 Chondrogene Differenzierung und enchondrale Ossifikation

Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Phasen der chondrogenen Differenzierung und enchondralen Ossifikation. Über den Pfeilen sind für das jeweilige Stadium charakteristische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren angegeben und unter den Pfeilen wichtige Transkriptionsfaktoren. Außerdem ist die Expressionsdauer typischer ECM-Proteine dargestellt, die die verschiedenen Stadien voneinander abgrenzt. (Abbildung modifiziert nach Goldring *et al.*, 2006)

1.5.1.2 Die Chondrogenese *in vitro*

Um die Chondrogenese von MSC *in vitro* zu induzieren, sind spezielle Kulturbedingungen nötig: zum einen eine 3D-Umgebung wie z.B. Hochzelldichtesysteme (*high-density cell culture*) wie Micromass-/Pelletkultur oder Scaffolds aus Biopolymeren (s. dazu auch Abschn. 1.6, S. 19) und zum anderen ein spezielles chondrogenes Medium. Das Standardmedium zur Induktion der chondrogenen Differenzierung besteht aus folgenden Komponenten: ein Basismedium (*Dulbecco's modified eagle's medium*, DMEM) mit einem hohen Glukosegehalt (4,5 g/l), Dexamethason, L-Prolin, Natriumpyruvat, Ascorbinsäure, Insulin, Transferrin,

Selensäure, Albumin, Linolensäure und TGF- β (Johnstone *et al.*, 1998). Ein hoher Gehalt an Glukose ist nötig, damit die Zellen im Inneren der Pellets/Scaffolds nicht absterben, sondern überleben und differenzieren können. Dexamethason, ein synthetisches Glucocorticoid mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, fördert die Matrixproduktion und hemmt katabole Prozesse, indem es die Aggrecanaseaktivität reduziert (Florine *et al.*, 2013; Tangtrongsup und Kisiday, 2016). L-Prolin ist eine nicht-essentielle Aminosäure und die Vorstufe von Hydroxyprolin. L-Prolin ist direkt an der Bildung von Kollagenen beteiligt (Hausmann und Neuman, 1961), da die α -Helices sich wiederholende Einheiten des Aminosäuretriplets Glycin-X-Y enthalten, wobei an der X- und Y-Position häufig Prolin bzw. 4-Hydroxyprolin vorkommt (Abschn. 1.2.1, S. 2). Natriumpyruvat wird Zellkulturmedien häufig als zusätzliche Energiequelle neben Glukose zugesetzt, obwohl die Zellen Pyruvat in der Glykolyse selbst herstellen, was anschließend in den Citratzyklus eingespeist und zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) genutzt wird. Ascorbinsäure ist ein kritischer Faktor für die Knorpel- und Knochenentwicklung und Vitamin C-Mangel führt beim Menschen zu Skorbut. Ascorbinsäure ist ein essentieller Kofaktor der Prolyl- und Lysyl-Hydroxylase, wichtige Enzyme für die Hydroxylierung von Prolin bzw. Lysin zu Hydroxyprolin bzw. Hydroxyllysyl während der Kollagenbiosynthese. Außerdem ist Ascorbinsäure u.a. für die Differenzierung von MSC in Adipozyten, Osteoblasten, Myoblasten und Chondrozyten nötig (Temu *et al.*, 2010). Zellkulturmedien wird meist das stabilere Ascorbat-2-Phosphat, ein Salz der Ascorbinsäure, zugesetzt. Insulin, ein Hormon mit ähnlicher Struktur wie IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), aktiviert den IGF-1-Rezeptor, stimuliert die ECM-Produktion und beeinflusst die chondrogene Differenzierung von MSC Dosis-abhängig (Mueller *et al.*, 2013). Transferrin, ein für den Eisentransport verantwortliches Glykoprotein, ist ein wichtiges extrazelluläres Antioxidans. Es bindet Eisen mit so hoher Affinität, dass praktisch kein freies Eisen mehr vorkommt, um die Produktion von freien Radikalen zu katalysieren. Glutathion, ein weiteres Antioxidans, wird ubiquitär von allen Zelltypen produziert und ist für Proliferation und Vitalität wichtig. In der reduzierten Form besitzt Glutathion eine freie Thiolgruppe. Wenn es oxidiert wird, kann es freie Radikale, die bei der Zellatmung entstehen können, unschädlich machen, indem es Elektronen auf ROS (*reactive oxygen species*) überträgt. Zwei oxidierte Glutathion-Moleküle bilden ein Dimer. Selen ist ein Kofaktor der Glutathionreduktase, ein Enzym, das aus dem Dimer wieder zwei reduzierte Monomere macht. Auch das schon erwähnte Vitamin C

besitzt antioxidative Eigenschaften. Die Zugabe von Antioxidantien zum Zellkulturmedium soll die Zellen vor oxydativem Stress durch freie Sauerstoffradikale, die DNA, Lipidmembranen und Proteine schädigen, schützen (Loring und Peterson, 2012). Linolsäure wird bei Serum-freiem Medium als eine Fettsäurequelle hinzugegeben und ist u.a. ein Vorläufer von Prostaglandinen. Albumin dient als Carrier u.a. für Hormone, Wachstumsfaktoren, Lipide, Aminosäuren und Metallionen (Francis, 2010). Der wichtigste Induktionsfaktor für die chondrogene Differenzierung ist der Wachstumsfaktor TGF- β . Alle drei Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3) sind in der Lage, die Chondrogenese zu induzieren, am häufigsten werden jedoch TGF- β 1 und TGF- β 3 in chondrogenem Medium verwendet.

Werden BMSC in 3D-Kulturbedingungen in chondrogenem Medium kultiviert, beginnen sie Chondrozyten-spezifische Gene zu exprimieren und Knorpel-matrixproteine zu synthetisieren. Typischerweise werden BMSC für 21-28 Tage chondrogen differenziert. Fibromodulin ist die erste Matrixkomponente, deren Genexpression hochreguliert wird, gefolgt von COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*). Innerhalb der ersten 6 Differenzierungstage setzt auch die Protein-expression der Kernproteine von Aggrecan, Versican und Decorin ein und die Akkumulierung von GAGs beginnt. Ab Tag 7 kann die Genexpression von Kollagen II und Chondroadherin detektiert werden zusammen mit der Proteinexpression des Biglycan Core Proteins. Ab diesem Zeitpunkt zeigt sich auch eine stabile Sulfatierungsrate von Chondroitinsulfatketten. Die Akkumulierung von GAGs geht über die nächsten 14 Tage weiter und führt zu Bildung von reifen Chondrozyten (Barry *et al.*, 2001).

1.5.2 Mesenchymale Stammzellen für die Knorpelregeneration

Der Einsatz adulter MSC ist – im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen – ethisch unbedenklich und MSC können außerdem leicht z.B. aus Knochenmark oder Fettgewebe isoliert werden. Wegen ihrer hohen Proliferationskapazität können MSC *in vitro* expandiert und chondrogen vordifferenziert werden und stellen somit eine potentielle Alternative zu Chondrozyten für Zell-basierte Therapien selbst von größeren Knorpeldefekten wie u.a. bei OA dar.

Zunächst wurden MSC in zahlreichen Tiermodellen wie z.B. in Kaninchen getestet (Wakitani *et al.*, 1994). Wakitani *et al.* (2002) waren die ersten, die MSC für die Behandlung von OA-Knorpeldefekten beim Menschen einsetzten.

Kuroda *et al.* (2007) konnten bei einem jungen Athleten mit Knorpeldefekt am Femurkondylus mit transplantierten, autologen MSC einen gewissen Erfolg erzielen. Es folgten weitere Studien zum Einsatz von Knochenmarks-MSC für die Knorpelregeneration. Eine Übersicht von klinischen Studien zum Einsatz von BMSC u.a. bei OA-bedingten Knorpeldefekten findet sich z.B. bei Gupta *et al.* (2012), Grässel und Lorenz (2014) und Mamidi *et al.* (2016). Aufgrund der anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften von MSC ist auch die Verwendung allogener BMSC möglich. Sowohl autologe als auch allogene BMSC-Therapien für die Knorpelreparatur zeigten recht akzeptable klinische Ergebnisse (Gupta *et al.*, 2012), allerdings fehlen Langzeitstudien. Cui *et al.* (2016) stellten in einer Metaanalyse fest, dass sich das Gesamt-Outcome von Patienten mit Knie-OA durch die Verabreichung von MSC verbesserte, d.h. es trat eine Schmerzlinderung und funktionelle Verbesserung bei Nachuntersuchungen nach 12 und 24 Monaten ein. Dabei scheinen das Alter der Patienten (< 60 Jahre), der BMI (*body mass index*), die Defektgröße (< 6 cm²) und der OA-Grad einen Einfluss auf den Therapieerfolg zu haben (Filardo *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015). Die Applikation kultivierter MSC in Gelenke scheint außerdem sicher zu sein und schwerwiegende, Therapie-bedingte Nebenwirkungen treten sehr selten auf (Peeters *et al.*, 2013). Allerdings ist der Mechanismus, wie BMSC in OA-Patienten zur Knorpelregeneration beitragen, noch nicht geklärt. Implantierte BMSC könnten die Proliferation und Differenzierung residenter Vorläuferzellen induzieren, selbst zu Matrix-bildenden Chondrozyten differenzieren oder durch ihre parakrine Aktivität zur intrinsischen Regeneration des Knorpels beitragen (Gupta *et al.*, 2012).

Bevor BMSC jedoch, trotz ihres unbestrittenen therapeutischen Potentials (Burke *et al.*, 2016), routinemäßig in der Klinik zur Behandlung von OA-Patienten eingesetzt werden können, um den künstlichen Gelenkersatz zu vermeiden oder zumindest hinauszuzögern, sind noch weitere Studien nötig. Auch bei MSC-basierten Therapie-strategien zur Knorpelregeneration gibt es einige Nachteile. Bei Chondrozyten in Expansionskultur besteht die Neigung zur Dedifferenzierung, MSC hingegen tendieren zur Hypertrophie, wenn sie dauerhaft chondrogenen Stimuli wie TGF- β und Dexamethason ausgesetzt sind (Hubka *et al.*, 2014). Hypertrophe MSC sind charakterisiert durch eine Zunahme des Zellvolumens, durch gesteigerte Expression von Kollagen X und MMPs sowie durch eine erhöhte ALP-Aktivität. Dies sind alles Ziele des Transkriptionsfaktors Runx2, der typischerweise mit osteogener

Differenzierung assoziiert ist (Studer *et al.*, 2012). Ein weiterer Nachteil ist, dass hypertrophe MSC eher Kollagen I als II exprimieren (Scotti *et al.*, 2010). Dies fördert die Bildung von fibrösem statt hyalinem Knorpel. *In vitro* kann die Kokultur von MSC mit Chondrozyten zwar die chondrogene Differenzierung fördern und die Hypotrophie von MSC verhindern (Hubka *et al.*, 2014). Bei allen Zell-basierten Strategien zur Knorpelregeneration bei OA bleibt jedoch das Problem, dass gesunde Zellen in eine kranke Mikroumgebung eingebracht werden. Da sie dort dann gesunden, funktionellen Knorpel produzieren sollen, ist ein besseres Verständnis des Verhaltens der Zellen nach der Transplantation nötig. Außerdem gilt es für eine standardisierte Anwendung von MSC in der Klinik u.a. folgende Probleme zu lösen: die Lagerung allogener MSC, da Dimethylsulfoxid (DMSO), das für die Kryokonservierung üblicherweise benutzt wird, toxisch ist; die optimale Dosis injizierter MSC; die Kontrolle von Batch-to-Batch-Variationen (Mamidi *et al.*, 2016) und die Verhinderung hypertropher Differenzierung, d.h. die Induktion eines stabilen chondrogenen Phänotyps.

1.6 3D *in vitro* Kokulturmodelle

Für die Entwicklung neuer, Zell-basierter Methoden für die Regeneration von OA-bedingten Knorpelschäden ist ein besseres Verständnis der OA-Mikroumgebung wichtig, in welche die Zellen mit oder ohne Trägermaterial implantiert werden sollen, um in der kranken Umgebung gesunden Knorpel zu bilden. Auf der anderen Seite können die implantierten BMSC/Chondrozyten auch einen Einfluss auf den geschädigten artikulären OA-Knorpel/subchondralen OA-Knochen haben. Die Interaktion zwischen BMSC/Chondrozyten und Knorpel-/Knochenexplantaten kann *in vitro* mittels verschiedener Kokulturmodelle untersucht werden. Eine Möglichkeit sind sog. Transwell-Inserts für Zellkulturplatten, bei denen die Zellen auf dem Plattenboden von den Zellen im Insert durch eine permeable Membran getrennt sind. Diese Methode ist jedoch für Chondrozyten bzw. chondrogen differenzierende BMSC ungeeignet, da Chondrozyten eine dreidimensionale (3D) Umgebung brauchen, um ihre typische, runde Morphologie und ihre Matrix-produzierenden Eigenschaften beizubehalten. In Monolayer-Kultur ändern sie ihre Form und bilden zunächst sternförmig Fortsätze aus, nehmen mit der Zeit eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie an, proliferieren und hören auf hyaline Knorpel-ECM zu synthetisieren, d.h. sie dedifferenzieren (Abbott und Holtzer, 1966; Chacko *et al.*, 1969). Zu den

phänotypischen Veränderungen während der Dedifferenzierung in 2D-Kultur gehören außerdem eine verminderte Expression von Chondrozytenmarkern wie Kollagen II, Aggrecan und des Transkriptionsfaktors SOX9 sowie eine erhöhte Expression fibroblastischer Marker wie Kollagen I und Versican (Hubka *et al.*, 2014). Besser geeignet sind deshalb 3D-Kulturmethode wie z.B. Hochzelldichtesysteme (*high-density cell culture*) oder das Einbetten der Zellen in Hydrogelen aus Biopolymeren wie z.B. Kollagen, Alginat, Chitosan oder Fibrin.

1.6.1 Indirekte Kokultur: Zellen als Micromass Pellets in konditioniertem Medium

3D-Standardmethoden für die Chondrogenese von MSC *in vitro* sind die sog. Micromass- und Pellet-Kultur (Zhang *et al.*, 2010). Die Micromass-Kultur wurde zunächst für Studien zur embryonalen Skelett- und Knorpelentwicklung im Hühnchen verwendet (Ahrens *et al.*, 1977; Mello und Tuan, 1999; San Antonio und Tuan, 1986) und später auch für Chondrozyten und MSC angewendet (Chen *et al.*, 1993; Scharstuhl *et al.*, 2007). Hierfür wird ein 20 µl-Tropfen mit 4×10^5 Zellen in ein Well einer 48-Well Platte pipettiert und den Zellen vor Zugabe von Medium zwei bis drei Stunden Zeit zum Adhärenz gegeben und ein Sphäroid zu bilden. Bei der Pellet-Kultur, von Johnstone *et al.* für die chondrogene Differenzierung von Kaninchen-BMSC entwickelt, werden 2×10^5 Zellen in chondrogenem Medium bei 500xg in 15 ml-Röhrchen aus Polypropylen mit konischem Boden zu einem Aggregat zentrifugiert (Johnstone *et al.*, 1998), das auch als Micromass Pellet bezeichnet wird. Mittels Micromass Pellet-Kultur ist allerdings nur eine direkte Kokultur zweier Zelltypen wie beispielsweise MSC und Chondrozyten gemischt in einem Pellet möglich. Die Kokultur mit Geweben wie z.B. Knorpel- oder Knochenexplantaten ist nur indirekt möglich, indem die Pellets z.B. in konditioniertem Medium kultiviert werden, d.h. in Medium, in welchem zuvor das Gewebe kultiviert wurde. Damit lässt sich der Einfluss löslicher, vom Gewebe ins Medium sezernierter Faktoren auf die als Micromass Pellets kultivierten Zellen untersuchen.

1.6.2 Direkte Kokultur: Zellen in Fibringelen auf Explantaten

Um Zellen direkt auf Gewebeexplantaten zu kultivieren, müssen die Zellen mittels eines Trägermaterials auf das Explantat aufgebracht werden, um ein Abschwimmen der Zellen bei Mediumzugabe zu verhindern. Eine Möglichkeit ist das Einbetten der

Zellen in Fibringel, das eine etablierte 3D-Umgebung für Chondrozyten bzw. für die chondrogene Differenzierung von MSC bietet. Fibringele lassen sich sogar autolog herstellen, indem aus Plasma des Patienten gewonnenes Fibrinogen mit Thrombin gemischt wird. Es ist aber auch sog. Fibrinkleber für die klinische Anwendung verfügbar. Fibringele bieten eine hohe Aussaat-effizienz, eine gleichmäßige Zellverteilung und besitzen gute Adhäsionsfähigkeiten. Bei Fibrin handelt es sich um ein Biopolymer. Ein Fibrinogen-Molekül besteht aus zwei Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Untereinheit wiederum setzt sich aus drei Polypeptidketten (α , β und γ) zusammen. Thrombin spaltet das Fibrinopeptid A von den α -Ketten und Fibrinoprotein B von den β -Ketten ab. Dies führt zu Konformationsänderungen, wodurch Polymerisationsstellen frei werden und die Fibrin-Monomere ein vernetztes Fibringerüst bilden (Ahmed *et al.*, 2008). Fibringele werden häufig als Scaffolds für Zell-basierte Tissue Engineering-Experimente verwendet. Leyh *et al.* (2014a, 2014b) z.B. etablierten ein *in vitro* Kokulturmodell, bei dem Zellen in Fibringele eingebettet direkt auf Knorpel- und Knochenexplantaten kokultiviert werden. Mit diesem Kokulturmodell kann zum einen der Einfluss von OA-Gewebe auf die kokultivierten Zellen untersucht werden und zum anderen die Interaktion zwischen zwei gemeinsam kultivierten verschiedenen Zelltypen. Letzteres ist ebenfalls interessant, da es verschiedene Studien gibt, wie sich Chondrozyten und MSC gegenseitig beeinflussen. Bei direkter Kokultur von MSC mit Chondrozyten induzieren MSC beispielsweise die Proliferation von Chondrozyten und Chondrozyten wiederum stimulieren die Chondrogenese von MSC (Acharya *et al.*, 2012). Werden MSC mit Chondrozyten in einem Hydrogel gemischt, führt dies zu verbesserten biomechanischen und biochemischen Eigenschaften des Knorpelersatzgewebes (Bian *et al.*, 2011). Leyh *et al.* zeigten, dass die direkte Kokultur von BMSC/Chondrozyten mit OA-Knorpel-/OA-Knochenexplantaten und eine direkte Trikultur aus einem Gemisch beider Zelltypen auf OA-Gewebeexplantaten zu einer veränderten Zusammensetzung der neugebildeten ECM mit verminderten mechanischen und biochemischen Eigenschaften führt (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b). Die Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten reduzierte v.a. die Expression von Kollagenen wie Kollagen I, II und III.

1.7 microRNAs

microRNAs (Abkürzung: miRNAs oder miRs) sind post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression und könnten somit für die reduzierte Kollagenexpression von MSC und Chondrozyten in Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten verantwortlich sein.

1.7.1 Biogenese und Funktion

miRs sind kurze (~22 Nukleotide), endogene, nicht Protein-kodierende einzelsträngige RNA-Moleküle, die die Expression ihrer Zielgene post-transkriptionell regulieren, indem sie die Degradation der mRNA einleiten oder deren Translation verhindern.

Über miRs wurde erstmals 1993 berichtet als man herausfand, dass beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* das Gen *lin-4* nicht für ein Protein, sondern für zwei ~60 bzw. ~20 Nukleotid-lange RNA-Moleküle kodiert. Es stellte sich heraus, dass die Sequenz dieser kurzen RNAs komplementär zu einer Basenfolge in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der *lin-14* mRNA ist (Lee *et al.*, 1993). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Proteinexpression von *lin-14* durch *lin-4* negativ reguliert wird (Wightman *et al.*, 1993). Später stellte sich heraus, dass diese Form des post-transkriptionellen Gen-Silencings durch eine kleine, regulatorische RNA kein seltenes, Nematoden-spezifische Phänomen ist. Nach *lin-4* wurde mit *let-7* eine zweite miR beschrieben, die die Expression des Gens *lin-41* reguliert. Bei *let-7* und *lin-41* handelt es sich um evolutionär konservierte Gene, die in mehreren Spezies, u.a. auch in Vertebraten, vorkommen (Pasquinelli *et al.*, 2000). Datenbanken wie z.B. miRBase sagen für das menschliche Genom mehrere Tausend miR-Sequenzen vorher und eine einzelne miR kann mehrere Hunderte Ziel-mRNAs haben (Selbach *et al.*, 2008). Schätzungen gehen davon aus, dass über 60 % der humanen Proteinkodierenden Gene miR-Bindestellen in der 3'-UTR besitzen (Friedman *et al.*, 2009) und durch miRs reguliert werden.

Die verschiedenen Schritte der Biogenese von miRs sind vereinfacht in Abb. 6 dargestellt. Die Synthese einer miR beginnt im Zellkern mit der Transkription eines miR-Gens durch die RNA-Polymerase II oder III (Pol II/III). Das Transkript, die sog. Primär-miRNA (*primary* miRNA, *pri-miRNA*), bildet eine doppelsträngige Haarnadelstruktur (*stem-loop*) und wird von Drosha, einer RNase III-Endonuclease, in ein kürzeres Transkript (~70-100 Nukleotide) gespalten, die sog. Vorläufer-miRNA (*precursor* miRNA, *pre-miRNA*). Die *pre-miRNA* wird über den Exportrezeptor

Exportin-5 aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert, wo das Enzym Dicer, eine weitere RNAase III-Endonuclease, den Loop absplattet. Dadurch entsteht eine doppelsträngige miRNA-Duplex von ca. 22 Nukleotiden. Proteine aus der Argonaute-Familie binden an die miR und bilden den sog. *RNA-induced silencing complex* (RISC). Der sog. Passenger-Strang der miRNA wird degradiert und die reife, einzelsträngige miR im RISC-Komplex bindet an die Ziel-mRNA. Meist findet die Interaktion zwischen miR und mRNA in der 3'-UTR der mRNA statt, kann aber auch in der 5'-UTR oder in Protein-kodierenden Regionen der mRNA erfolgen. Ist die Sequenz der mRNA fast komplett komplementär zur miR, kommt es zur Spaltung der mRNA. Ist die Basenpaarung nicht komplett komplementär, wird die mRNA nicht durch RISC gespalten, sondern ihre Translation verhindert (Bartel, 2004; Hong und Reddi, 2012). Meist kommt es jedoch zu einer Abnahme der mRNA-Level (Guo *et al.*, 2010).

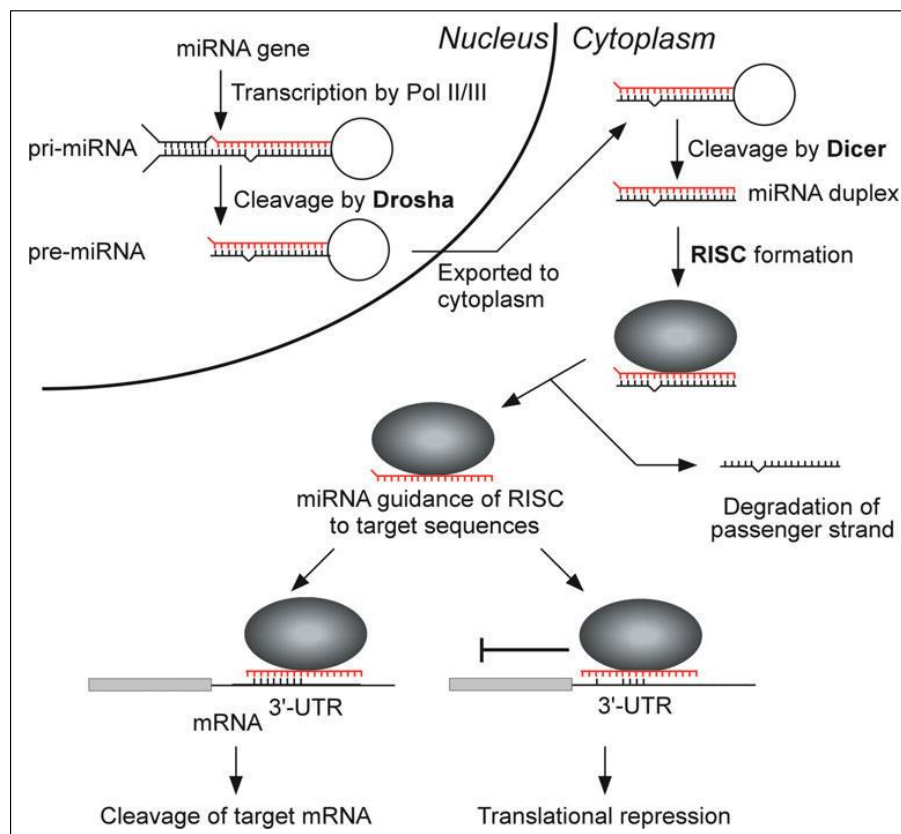


Abb. 6 miR-Biogenese und post-transkriptionelle Regulationsmechanismen von Ziel-mRNAs

Nach der Transkription wird die pri-miRNA (*primary* miR) von Drosha gespalten und die pre-miRNA (*precursor* miR) ins Zytoplasma exportiert, wo eine zweite Spaltung durch Dicer stattfindet. Die miRNA-Duplex bildet mit Argonaute-Proteinen den *RNA induced silencing complex* (RISC), der Passenger-Strang wird abgebaut und die reife miR bindet meist in der 3'-UTR an die Ziel-mRNA. Je nach dem Grad der Komplementarität zwischen miR und mRNA führt die Interaktion zur Spaltung der mRNA oder es wird nur die Translation verhindert. (Abbildung aus Hong und Reddi, 2012)

Da die miR-Biosynthese über mehrere Schritte abläuft, ergeben sich viele Möglichkeiten zur Regulation der miR-Expression. Zum einen kann die Transkription von miR-Genen direkt über Transkriptionsfaktoren bzw. epigenetisch (DNA-Methylierung, Histon-Modifikation) reguliert werden. Zum anderen gibt es post-transkriptionelle Mechanismen wie RNA-Editing (z.B. die Umwandlung von Adenosin zu Inosin), RNA-Methylierung, Uridylierung und Adenylierung. Außerdem können alle Schritte des Processings bis zur reifen miR reguliert werden wie z.B. über die Regulation der Aktivität beteiligter Enzyme (Drosha, Dicer). Schließlich kann auch über die Aktivität von Nukleasen der miR-Turnover/Abbau reguliert werden und so der Level an funktionellen miRs kontrolliert werden (Davis und Hata, 2009; Ha und Kim, 2014).

miRs als post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression erfüllen vielfältige Funktionen. Sie sind an der Regulation der Entwicklung von Organismen, der Differenzierung in verschiedene Zelltypen und an der Kontrolle diverser physiologischer und zellulärer Prozesse wie z.B. Proliferation oder Apoptose beteiligt. Die hohe Anzahl an miR-Genen und potentiellen Ziel-mRNAs lassen vermuten, dass miRs auch eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen.

1.7.2 Die Rolle von miRs während der Chondrogenese und in der Pathogenese der OA

miRs spielen eine Rolle während der Knorpelentwicklung und sind an der Knorpelhomöostase beteiligt. Außerdem haben sie einen Einfluss auf die Entstehung der OA, indem sie u.a. Matrix-Produktion/-Turnover und Wachstumsfaktoren regulieren sowie Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Chondrozyten steuern (Gibson und Asahara, 2013).

Wird Dicer, ein wichtiges Enzym der miR-Biogenese, während der murinen Skelettentwicklung in der Wachstumsfuge ausgeschaltet, führt dies zu verringerter Proliferation und gleichzeitig zu gesteigerter hypertropher Differenzierung von Chondrozyten (Kobayashi *et al.*, 2008). An der Regulation der chondrogenen Differenzierung von MSC zu Chondrozyten sind viele miRs beteiligt. Die miR-Expressionsprofile von undifferenzierten MSC und Chondrozyten unterscheiden sich: einige miRs sind hochreguliert, andere herunterreguliert und unter den potentiellen Ziel-mRNAs dieser miRs sind Gene, die bei der chondrogenen Differenzierung eine Rolle spielen (Barter *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2010; Sorrentino *et al.*, 2008). Zahlreiche miRs, von denen einige einschließlich ihrer Ziel-mRNAs

identifiziert sind (Abb. 7), sind an der Regulation der Chondrogenese beteiligt, indem sie z.B. die Expression von Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren der einzelnen Differenzierungsschritte modulieren (Wu *et al.*, 2014).

miRs sind als Regulatoren auch an der Knorpelhomöostase beteiligt. Sie regulieren das Gleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen, indem sie die Expression von Matrixproteinen und die Aktivität von Abbauenzymen modulieren. Die Knorpel-spezifische miR-140 z.B. scheint eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase zu haben. miR-140-Knockout-Mäuse entwickeln OA-ähnliche Knorpelveränderungen wie Proteoglykan-Verlust, Fibrillierung des artikulären Knorpels und gesteigerte Expression von ADAMTS-5, ein Aggrecan-abbauendes Enzym, dessen Expression in Wildtypmäusen von miR-140 inhibiert wird (Miyaki *et al.*, 2010).

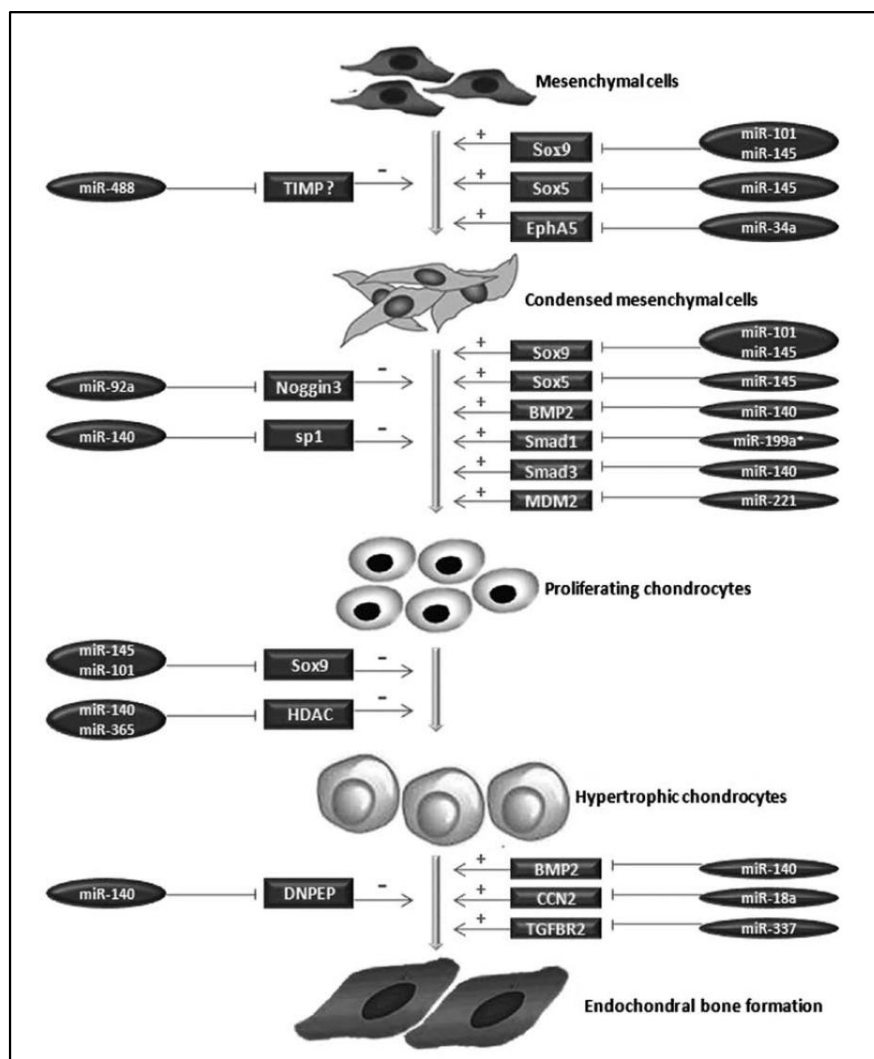


Abb. 7 miRs und Zielgene während der Chondrogenese

miRs inhibieren Faktoren, die bestimmte Phasen der Chondrogenese entweder hemmen (-) oder fördern (+). (Abbildung aus Wu *et al.*, 2014)

Da ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen miRs an der Knorpelentwicklung und -aufrechterhaltung mitwirkt, sind auch regulatorische Effekte von miRs bei der Entstehung von OA denkbar. Studien zeigen, dass sich miR-Expressionsprofile von normalem und OA-Knorpel bzw. Chondrozyten unterscheiden (Diaz-Prado *et al.*, 2012; Iliopoulos *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009). Allerdings gibt es bei den hoch- bzw. herunterregulierten miRs wenig Übereinstimmung zwischen verschiedenen Studien. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass OA-Knorpel unterschiedlicher Krankheitsgrade verwendet wurde. Außerdem gibt es eine Vielzahl an Publikationen, die einzelne miRs im Zusammenhang mit Knorpelhomöostase und OA-Pathogenese untersucht haben. Eine tabellarische Zusammenfassung von unterschiedlich exprimierten miRs und ihrer Zielgene findet sich bei Mirzamohammadi *et al.* (2014). Eine miR kann jedoch Bindestellen in sehr vielen mRNAs haben und eine mRNA wiederum weist Bindestellen für viele verschiedene miRs auf. Deshalb wird es keine einzelne, OA-spezifische miR geben, sondern ein komplexes Zusammenspiel mehrerer miRs und ihrer Targtes wird zur Entstehung und Progression von OA beitragen.

1.7.3 Spezielle miRs und ihre potentiellen Zielgene

Da die Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten u.a. die Expression der Kollagene I, II und III in Chondrozyten und chondrogen differenzierenden MSC reduziert (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b) und miRs als post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression in Frage kommen, werden im folgenden einige miRs und ihre potentiellen Zielgene, die in diesem Kontext eine Rolle spielen könnten, vorgestellt.

1.7.3.1 miR-675

H19, eine ~2 kb-lange nicht-proteinkodierende RNA, dient als Primär-miR, aus der die reife miR-675 hervorgeht (Cai und Cullen, 2007). Die Expressionslevel von H19 sind verglichen mit normalem Knorpel in OA-Knorpel signifikant höher (Steck *et al.*, 2012) und in humanen artikulären Chondrozyten vergleichbar mit denen der häufigsten Knorpelmatrixgenen Kollagen II und Aggrecan (Dudek *et al.*, 2010). Die Expression von H19 ist abhängig von SOX9, dem Mastertranskriptionsfaktor der Chondrogenese. H19 und miR-675 werden v.a. im Knorpel exprimiert und wurden in sehr geringem Maße noch in Herz- und Lungengewebe von Mäusen detektiert. miR-675 reguliert die Expression von Kollagen II positiv: Inhibition von miR-675 reduziert die Kollagen II-Genexpression und Proteinsekretion in den Zellkulturüberstand und Überexpression von miR-675 erhöht die COL2A1-mRNA-Level und die sezernierten

Proteinlevel. Sox9 kann somit die Expression von *COL2A1* über miR-675 aktivieren, in dem der Transkriptionsfaktor die Expression von H19 fördert. Dies führt zu erhöhten Leveln der reifen miR-675, die wiederum verstärkt einen postulierten Repressor von *COL2A1* inhibiert, wodurch mehr *COL2A1* transkribiert wird (Dudek *et al.*, 2010). Umgekehrt könnten reduzierte miR-675-Level für die verringerte Kollagen II-Expression von Chondrozyten und BMSC in Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten verantwortlich sein.

1.7.3.2 miR-124a

Die Expression von *COL2A1* kann aber auch direkt von Sox9 gesteuert werden (Bell *et al.*, 1997). Es gibt mehrere miRs, für die Bindestellen in der SOX9-mRNA nachgewiesen wurden: z.B. miR-101 (Dai *et al.*, 2012), miR-145 (Martinez-Sanchez *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011), miR-495 (Lee *et al.*, 2014), miR-1247 (Martinez-Sanchez und Murphy, 2013) und miR-124a (Cheng *et al.*, 2009; Real *et al.*, 2013). miR-124a wurde in dieser Arbeit als potentieller indirekter Regulator der *COL2A1*-Expression in BMSC und Chondrozyten in Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten untersucht.

Ein weiteres mittels Luciferase-Reporter-Assay bestätigtes Zielgen der miR-124a neben SOX9 ist der *connectiv tissue growth factor*, kurz CTGF (Lv *et al.*, 2011). CTGF ist das zweite von inzwischen sechs entdeckten Mitgliedern der sog. CCN-Proteinfamilie, benannt nach *cysteine-rich protein 61* (Cyr61=CCN1), *CTGF* und *nephroblastoma overexpressed protein* (Nov=CCN3). CTGF wird deshalb auch als CCN2 bezeichnet (Brigstock, 1999; Perbal, 2004). Der historische, heute nicht mehr gebräuchliche Name lautete *fibroblast-inducible secreted protein-12* (FISB12) (Ryseck *et al.*, 1991). Manchmal wird auch die Bezeichnung *hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24* (Hcs24) verwendet und laut Kubota und Takigawa (2011) soll es acht verschiedene Namen geben. In dieser Arbeit wird die Bezeichnung CTGF verwendet.

CTGF wird von verschiedenen Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), Glioblastomzellen und auch von Chondrozyten exprimiert (Brigstock, 1999). CTGF spielt eine Rolle bei der Knorpel- und Knochenentwicklung sowie bei der Knorpelhomöostase und -regeneration. Es bindet an ECM-Moleküle wie Aggrecan, Proteoglykane und Fibronectin, an Integrine, aber auch an andere Wachstumsfaktoren wie TGF- β , BMPs oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*). CTGF ist wichtig während der Chondrogenese und wird in

den Wachstumsfugen von Röhrenknochen während der enchondralen Ossifikation von hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Kubota und Takigawa, 2011). *In vitro* fördert CTGF die Proliferation von artikulären Chondrozyten ohne die hypertrophe Differenzierung zu induzieren (Nishida *et al.*, 2002). CTGF scheint auch die ECM-Zusammensetzung zu beeinflussen. Chondrozyten von *Ctgf*-Knockout-Mäusen, die nicht lebensfähig sind, exprimieren weniger Kollagen II- und Aggrecan-mRNA und Protein verglichen mit Chondrozyten von Wildtyp-Mäusen (Nishida *et al.*, 2007).

Ob die *COL2A1*-Expression in BMSC und Chondrozyten in Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten möglicherweise durch einen Mangel an CTGF, ausgelöst durch verstärkte Inhibition aufgrund einer gesteigerter miR-124a-Expression, reduziert wird, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

1.7.3.3 miR-29b

Die miR-29-Familie besteht aus drei Mitgliedern: miR-29a, miR-29b und miR-29c. miR-29a wurde als erstes entdeckt (Lagos-Quintana *et al.*, 2001), dann folgten miR-29b und miR-29c (Dostie *et al.*, 2003; Lagos-Quintana *et al.*, 2002). miRs-29 sind in zwei Genclustern kodiert: das Gen, das die Vorläufer von miR-29b-1 und miR-29a kodiert, ist auf Chromosom 7 lokalisiert, das Gen für miR-29b-2 und miR-29c auf Chromosom 1 (Mott *et al.*, 2010) (Abb. 8).

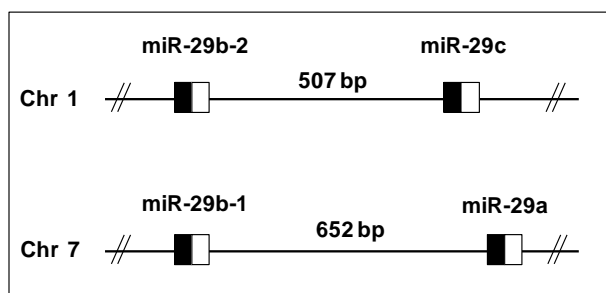


Abb. 8 Gencluster der Mitglieder der miR-29-Familie

Auf Chromosom 1 (Chr 1) sind die Vorläufer miR-29b-2 und miR-29c kodiert, auf Chromosom 7 (Chr 7) miR-29b-1 und miR-29a. Die schwarzen Boxen repräsentieren die Sequenz des Passenger-Strangs, die weißen Boxen die der reifen miRs. (Abbildung nach Mott *et al.*, 2010)

miR-29b-1 und miR-29b-2 führen zu einer reifen miR-29b mit identischer Sequenz. Alle reifen miRs-29 weisen außerdem in der Seed-Region (Nukleotide 2-7) die gleiche Basensequenz auf, wodurch sich ihre Zielgene überlappen. miR-29a und miR-29c unterscheiden sich nur in einem Nukleotid (Abb. 9) und die Sequenzen der reifen miRs-29 sind bei Mensch (*Homo sapiens*, hsa), Maus (*Mus musculus*, mmu) und Ratte (*Rattus norvegicus*, rno) konserviert (Kriegel *et al.*, 2012).

hsa, mmu, rno-miR-29a	UAGCACCAU CUGAAAUCGGUUA
hsa, mmu, rno-miR-29b	UAGCACCAU UUGAAAUCAGUGUU
hsa, mmu, rno-miR-29c	UAGCACCAU UUGAAAUCGGUUA
	Seed region

Abb. 9 Nukleotid-Sequenzen der Mitglieder der miR-29-Familie

Die Sequenzen sind in Mensch (hsa), Maus (mmu) und Ratte (rno) konserviert und Nukleotide, die sich zwischen den Mitgliedern der miR-29-Familie unterscheiden, sind rot hervorgehoben.

(Abbildung aus **Kriegel et al., 2012**)

Die miR-29-Familie ist an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse wie Proliferation (Wei *et al.*, 2013; Zhang und Zhou, 2015), Differenzierung (u.a. auch chondrogener Differenzierung (Guerit *et al.*, 2014)) und Apoptose beteiligt. miRs-29 inhibieren z.B. die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Tcl-1 (Pekarsky *et al.*, 2006), Mcl-1 (Mott *et al.*, 2007) und Bcl-2 (Xiong *et al.*, 2010). Außerdem modulieren die miR-29-Mitglieder die Zusammensetzung der ECM: mindestens 16 ECM-Zielgene wurden identifiziert, darunter mehrere Kollagen-Isoformen, Laminin γ 1, Integrin β 1, Elastin, Fibrillin 1 und MMP-2 (Kriegel *et al.*, 2012). miR-29b kann u.a. die Expression der Kollagene I und III direkt durch Bindung in der 3'-UTR der mRNA inhibieren (Cheng *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2010; Steele *et al.*, 2010).

Während einige Zielgene der miR-29-Familie inzwischen gut charakterisiert sind, ist bisher hingegen noch relativ wenig bekannt, wie die Expression der miR-29-Mitglieder reguliert wird. Die Promotorregionen der miR-29-Gene weisen etliche Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf. Von einigen Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc und NF κ B weiß man, dass sie die Expression von pre-miR-29a/b-1 und pre-miR-29b-2/c inhibieren (Amodio *et al.*, 2015).

Le *et al.* (2015) berichten, dass SOX9 die Expression von miR-29a-3p und miR-29b-3p in humanen Chondrozyten reprimiert und IL-1 β die Expression der miRs-29 stimuliert. Die Expression von miR-29 kann auch durch Stimulation mit LIF (Yu *et al.*, 2015), IFN- γ (Schmitt *et al.*, 2012) oder mit einem Zytokingemisch aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (Roggli *et al.*, 2012) gesteigert werden. Ob die bei Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten reduzierten Kollagen I und III Expressionslevel von Chondrozyten und BMSC durch erhöhte miR-29b-Level zu Stande kommen, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2 Ziel der Arbeit

Osteoarthritis ist u.a. gekennzeichnet durch eine progressive und irreversible Degradation und Erosion des artikulären Knorpels. Da Knorpelläsionen nicht spontan heilen und erodiertes Knorpelgewebe nicht regeneriert wird, sind für die Knorpelregeneration Zell-basierte Strategien mit Chondrozyten oder BMSC vielversprechend. Doch über die chondrogene Differenzierung von BMSC unter arthrotischen Bedingungen ist wenig bekannt.

Leyh *et al.* konnten bereits zeigen, dass die direkte Kokultur von BMSC/Chondrozyten mit OA-Knorpel-/Knochenexplantaten zu einer veränderten molekularen Zusammensetzung der neugebildeten ECM mit verminderten mechanischen und biochemischen Eigenschaften führte. Die Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten reduzierte vor allem die Expression von Kollagenen wie Kollagen I, II und III in den kokultivierten Zellen (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b).

Um die Qualität von regeneriertem Knorpelgewebe aus BMSC zu verbessern, ist ein besseres Verständnis der Signale aus der arthrotischen Mikroumgebung wie die Identifikation sezernierter Faktoren benachbarter Zellen und des modulierenden Einflusses von Gewebegrenzen des Knorpels und Knochens wichtig. Deshalb wurde in diesem Projekt die Interaktion zwischen artikulären Knorpel-/subchondralen Knochenexplantaten und differenzierten Chondrozyten/chondrogen differenzierenden BMSC mittels des von Leyh *et al.* etablierten *in vitro* Kokulturmodells untersucht.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Beeinflussen BMSC/Chondrozyten das Proteinprofil von kokultivierten Knorpel-explantaten?

Zur Klärung dieser Frage wurde mittels SDS-PAGE/2D-Gelelektrophorese nach Unterschieden im Proteinmuster zwischen OA- und nicht-OA (N)-Knorpel-explantaten gesucht, die mit BMSC/Chondrozyten oder zellfreien Fibringelen kokultiviert wurden.

2. Hat die Kokultur einen Einfluss auf die Proteinsekretion von artikulären Knorpel-explantaten und chondrogen differenzierenden BMSC?

Mittels eines Multiplex-Immunoassays, ELISA und Gelatine-Zymographie wurde nach unterschiedlich sezernierten Faktoren zwischen BMSC in Mono-/Kokultur mit OA-/N-Knorpel-explantaten sowie zwischen OA-/N-Knorpel-explantaten mit BMSC/zellfreien Fibringelen gesucht.

3. Beeinflusst die Kokultur mit Knorpel-/Knochenexplantaten die Expression von miRs in BMSC/Chondrozyten, die mit solchen Genen assoziiert sind, deren Expression durch Kontakt zu den Gewebeexplantaten verändert ist?

Um dies zu überprüfen wurde die miR- und Zielgenexpression von BMSC/Chondrozyten in Mono- und Kokultur mit Gewebeexplantaten mittels qPCRs analysiert und die Proteinsynthese mittels Western Blotting/ELISA untersucht.

4. Welchen Einfluss hat die miR-29b während der chondrogenen Differenzierung von BMSC in einer OA-Mikroumgebung auf die Expression der Kollagene I und III sowie auf metabolische Eigenschaften wie Apoptose und Proliferation?

Mittels miR-29b-Mimic/Inhibitor-Transfektion wurde miR-29b in BMSC überexprimiert/inhibiert und anschließend die Gen- und Proteinexpression von Kollagen I und III untersucht sowie ein Caspase-3/7-Apoptoseassay und BrdU-Proliferationsassay durchgeführt.

5. Welche Faktoren induzieren die miR-29b-Expression in chondrogen differenzierenden BMSC?

Um diese Frage zu beantworten, wurden BMSC mit verschiedenen Zytokinen stimuliert und die Auswirkung auf die miR-29b-Expression analysiert.

Diese Arbeit soll zu einem besseren Verständnis des Einflusses der OA-Mikroumgebung auf Chondrozyten und die chondrogene Differenzierung von BMSC beitragen, da dies klinisch für die regenerative Medizin und das Tissue Engineering relevant sein könnte, z.B. um Zell-basierte Therapieansätze für die Knorpelregeneration bei OA zu entwickeln oder zu optimieren.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert (GR 1301/13–1).

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Die Verwendung humanen Materials wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (Az: 14-101-0189; email: ethikkommission@klinik.ukr.de) und das schriftliche Einverständnis der OA-Patienten eingeholt. Die N-Knorpelproben wurde über die TETEC Tissue Engineering Technologies AG (Reutlingen) von Leichen aus den USA bezogen, bzw. wurden von Prof. Angele (Unfallchirurgie, Uniklinik Regensburg und Sporthopaedicum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark

Adulte mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden aus Knochenmark isoliert (BMSC), das aus Hüftköpfen von Patienten ausgespült wurde, denen aufgrund von Coxarthrose eine Endoprothese eingesetzt werden musste. Außerdem wurde Knochenmark aus Beckenknochenmaterial ausgewaschen, das bei der Vorbereitung des Acetabulums für das Einsetzen der Prothesenpfanne anfällt. Die Knochenmarkszellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das mit PBS (Sigma-Aldrich) ausgewaschene Knochenmark zunächst durch ein Zellsieb (70 μm , Corning) gefiltert, 30 ml wurden vorsichtig auf 15 ml Bicoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml, Biochrom) geschichtet und 30 min bei 600xg zentrifugiert. Die mononukleären Zellen der Interphase (*buffy coat*) wurden abpipettiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS in Proliferationsmedium (Tab. 2) in einer Zelldichte von $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ in T₁₇₅-Zellkulturflaschen (Corning) ausgesät. Nicht-adhärente Zellen wurden nach 5-7 Tagen mit dem ersten Mediumwechsel entfernt und die adhärenen BMSC bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % weiterkultiviert. Nach dem Splitten wurden die Zellen in einer Dichte von $3.000/\text{cm}^2$ ausgesät und in Passage 2 (P2) in Einfriermedium (Tab. 3) in flüssigem Stickstoff gelagert oder direkt bis P3 für anschließende Experimente kultiviert.

Insgesamt wurden BMSC von 45 verschiedenen OA-Patienten für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet (Altersdurchschnitt: $66,6 \pm 9,1$ Jahre; Altersspanne: 47 - 91 Jahre, 65 % weiblich).

Tab. 2 Proliferationsmedium für BMSC

Komponente	Hersteller
StemMACS MSC Expansion Medium, human	Miltenyi Biotec
0,2 % MycoZap Plus-PR	Lonza

Tab. 3 Einfriermedium für BMSC

Komponente	Hersteller
Proliferationsmedium	Miltenyi Biotec/Lonza
20 % FCS	Sigma-Aldrich
10 % DMSO	Carl Roth

3.1.2 *Population doubling level* und Proliferationsrate humaner Knochenmarkstammzellen

Der sog. *population doubling level* (PDL) gibt die Rate an, wie oft sich die Zellen einer Population seit ihrer Isolierung *in vitro* verdoppelt haben. Da BMSC im Knochenmark selten sind, ist es schwierig, die anfängliche Anzahl der BMSC in der ersten Kultur zu bestimmen. Deshalb wurden PDL erst nach der P0-Zellernte berechnet. Bei jedem Passagieren wurden die abtrypsinisierten BMSC mit einem Cedex-Zellzähler (Roche) gezählt und der kumulative PDL (CPDL) nach folgender Formel berechnet: $CPDL = X + 3,322 (\log N_E - \log N_A)$

X = PDL der vorherigen Passage

N_E = Anzahl der geernteten Zellen

N_A = Anzahl der ausgesäten Zellen

Die Proliferationsrate ergibt sich aus dem Quotienten von CPDL und der Anzahl der Tage in Kultur und wird in *population doublings* pro Tag angegeben.

3.1.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung humaner Knochenmarkstammzellen anhand von Oberflächenmarkern

Entsprechend den Kriterien der *international society for cellular therapy* (Dominici *et al.*, 2006) wurden stichprobenartig plastikadhärente BMSC-Zellpopulationen von sechs verschiedenen Patienten mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenmarker (*cluster of differentiation*) CD73, CD90 und CD105 und das Fehlen von CD19 und CD34 überprüft. Dazu wurden BMSC in Passage 3 abtrypsinisiert (Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich), in PBS (Sigma-Aldrich) resuspendiert, gezählt (Cedex Cell Counter, Roche) und auf 5×10^5 Zellen pro Rundboden-Röhrchen (Falcon) eingestellt. Nach dem Zentrifugieren (2 min, 1.677xg) wurde das Pellet in 90 µl FACS-Puffer (Tab. 4) resuspendiert, mit 10 µl humanem *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec) versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurden entsprechend Tab. 5 konjugierte Antikörper zugegeben und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde mit FACS-Puffer gewaschen, das Pellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer (BD FACS Calibur, BD Biosciences) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software, Version 7.6.5 (Treestar).

Tab. 4 FACS-Puffer

Komponente	Hersteller
PBS	Sigma-Aldrich
5 % FCS	Sigma-Aldrich
0,1 % Natriumazid	Sigma-Aldrich

Tab. 5 Antikörper und Isotypkontrollen

Antikörper (Isotyp)	Volumen für 10 ⁶ Zellen in 100 µl	Hersteller (Katalognummer)
PE anti-Human CD19 (Maus IgG1, κ)	20 µl	BD Pharmingen (#555413)
PE anti-Human CD34 (Maus IgG1, κ)	20 µl	BD Pharmingen (#550761)
FITC anti-Human CD73 (Maus IgG1, κ)	5 µl	BD Pharmingen (#561254)
FITC anti-Human CD90 (Maus IgG1, κ)	2 µl	BD Pharmingen (#561969)
PE anti-Human CD105 (Maus IgG1, κ)	5 µl	BD Pharmingen (#560839)
FITC Maus IgG1, κ Isotypkontrolle	20 µl	BD Pharmingen (#555748)
PE Maus IgG1, κ Isotypkontrolle	20 µl	BD Pharmingen (#555749)

3.1.4 Isolierung und Kultivierung humaner artikulärer Chondrozyten

Humane, artikuläre Chondrozyten wurden durch enzymatischen Verdau mit Kollagenase aus Knieknorpel von Patienten isoliert, denen aufgrund von Gonarthrose eine Knieendoprothese eingesetzt werden musste. Auch aus Knieknorpel von Traumapatienten oder Spendern nach dem Tod wurden Chondrozyten isoliert. Die OA-Knorpelproben wurden nach Geyer *et al.* (2009) und Leyh *et al.* (2014b)

zunächst makroskopisch klassifiziert anhand von Farbe, Oberflächenbeschaffenheit und Schnittfestigkeit beim Testen mit einem Skalpell (Feather). Nur von einigermaßen intakt erscheinenden Bereichen wurde der Knorpel vom subchondralen Knochen geschnitten, in eine Petrischale mit PBS überführt, mit einem Skalpell soweit wie möglich zerkleinert und in 50 ml Falcons überführt. Pro Gramm zerkleinertem Knorpel wurden 5 ml Verdaumedium (Tab. 6) zugegeben und für ca. 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, unverdaute Knorpelstückchen durch ein Zellsieb (70 µm, Corning) abfiltriert und die Chondrozyten pelletiert. Die Zellen wurden in 5-10 ml Proliferationsmedium (Tab. 7) resuspendiert und gezählt (Cedex Cell Counter, Roche). 3×10^6 Chondrozyten wurden entweder in T₁₇₅-Zellkulturflaschen ausgesät oder in Einfriermedium (Tab. 8) in flüssigem Stickstoff für spätere Experimente gelagert. Nach der Aussaat bzw. nach dem Auftauen wurde nach ca. 5-7 Tagen das Medium gewechselt und die Chondrozyten für 10-14 Tage kultiviert, ohne die Zellen zu passagieren.

Chondrozyten, die aus 15 OA-Knorpelstücken (Altersdurchschnitt: $67,1 \pm 11,8$ Jahre; Altersspanne: 46 - 82 Jahre, 53 % weiblich) und 5 N-Knorpelproben (Altersdurchschnitt: $58,6 \pm 4,7$ Jahre; Altersspanne: 52 - 65 Jahre, 60 % weiblich) isoliert wurden, wurden für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

Tab. 6 Verdaumedium

Komponente	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich
1 % Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich
500 U/ml Collagenase, Type 2	Worthington

Tab. 7 Proliferationsmedium für Chondrozyten

Komponente	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich
10 % FCS	Sigma-Aldrich
1 % Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich

Tab. 8 Einfriermedium für Chondrozyten

Komponente	Hersteller
Proliferationsmedium	Sigma-Aldrich
20 % FCS	Sigma-Aldrich
10 % DMSO	Carl Roth

3.1.5 Generierung artikulärer Knorpel- und subchondraler Knochenexplantate

Für die Generierung artikulärer Knorpel- und subchondraler Knochenexplantate wurden die OA-Knorpelproben zunächst wie unter Abschnitt 3.1.4 (S. 34) beschrieben klassifiziert, und nur von als geeignet eingestuften Bereichen der Knorpel vom Knochen abgetrennt. Aus diesen OA-Knorpelstückchen, den Trauma-knorpelproben und dem N-Knorpel – entnommen aus Leichen – wurden mit einer Hautstanze (*Biopsy punch*, Stiefel) runde Explantate mit einem Durchmesser von 8 mm und – je nach Dicke der noch verbliebenen Knorpelschicht, die von Patient zu Patient schwankte – einer Höhe von 1-3 mm ausgestochen. Für die anschließende direkte Kokultur (Abschn. 3.1.6.1, S. 37) mit BMSC und Chondrozyten wurden die ausgestanzten Knorpel-explantate unter Beibehaltung ihrer ursprünglichen Orientierung mit der artikulären Oberfläche nach oben in eine Petrischale mit Chondrozyten-Proliferationsmedium (Tab. 7, S. 35) überführt und im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) aufgehoben. Für die Herstellung von konditioniertem Medium (KM) für die indirekte Kokultur (Abschn. 3.1.6.2, S. 39) wurden die Knorpel-explantate in 12-Well-Platten mit chondrogenem Medium (Tab. 10, S. 38) überführt. Explantate wurden aus Knorpel von 57 OA-Patienten (Altersdurchschnitt: 65,6 ± 8,4 Jahre; Altersspanne: 50 - 84 Jahre, 60 % weiblich) und 14 N-Patienten (Altersdurchschnitt: 55,1 ± 19,3 Jahre; Altersspanne: 15 - 75 Jahre, 50 % weiblich) gewonnen.

Für die Generierung von subchondralen Knochenexplantaten aus OA-Patienten wurde der Knorpel mit einem Skalpell komplett entfernt. Das Knochenstück wurde in einen Schraubstock eingespannt und mit chirurgischen Zangen wurden ca. 5 x 5 mm große Knochenquadrate zurechtgebrochen/geschnitten. Diese Knochenexplantate wurden in Petrischalen mit Chondrozyten-Proliferationsmedium im Inkubator bis zur Verwendung für Kokulturexperimente aufgehoben. Es wurden OA-Knochen-explantate von sechs verschiedenen Patienten verwendet (Altersdurchschnitt: 61,8 ± 4,3 Jahre; Altersspanne: 57 - 68 Jahre, 50 % weiblich).

Insgesamt wurde Material von 72 verschiedenen OA-Patienten für die Generierung von Knorpel- und Knochenexplantaten, für die Herstellung von konditioniertem Medium und für die Isolierung von Chondrozyten verwendet (Altersdurchschnitt: 65,9 ± 9,1 Jahre; Altersspanne: 46 - 84 Jahre, 57 % weiblich). Insgesamt 14 N-Knorpel-proben von Traumapatienten (n=4) bzw. Leichen (n=10) wurden für die Generierung von Knorpel-explantaten und für die Isolierung von Chondrozyten verwendet (Altersdurchschnitt: 55,1 ± 19,3 Jahre; Altersspanne: 15 - 75 Jahre, 50 % weiblich).

3.1.6 3D-Kokulturmodelle für die chondrogene Differenzierung

Da eine 3D-Umgebung die chondrogene Differenzierung von BMSC begünstigt und Chondrozyten unter 3D-Bedingungen ihren Phänotyp behalten, wurden die Kokulturerperimente in 3D-Kultur durchgeführt.

3.1.6.1 Direkte Kokultur: Zellen in Fibringelen auf Explantaten

Für die direkte Kokultur von BMSC, Chondrozyten und einem Gemisch beider Zelltypen auf Knorpel- und Knochenexplantaten wurde ein von Leyh *et al.* etabliertes und charakterisiertes Kokulturmodell angewendet (Abb. 10), bei dem die Zellen in Fibringelen eingebettet wurden (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b).

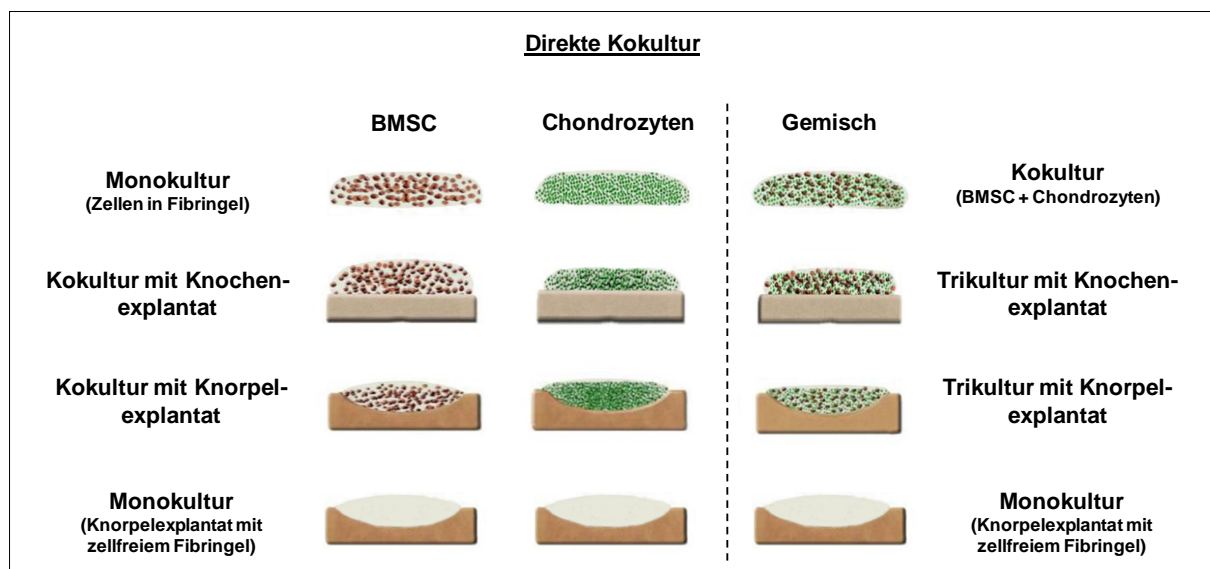


Abb. 10 Direkte Kokultur: Zellen in Fibringel auf Gewebeexplantaten

BMSC bzw. Chondrozyten wurden eingebettet in Fibringel alleine (Monokultur) oder auf Knochen- und Knorpel-explantaten (Kokultur) kultiviert. Zusätzlich wurde ein Gemisch aus BMSC und Chondrozyten (1:1) eingebettet in Fibringel alleine (Kokultur) oder auf Knochen- und Knorpel-explantaten (Trikokultur) kultiviert. Außerdem wurden Knorpel-explantate mit einem zellfreien Fibringel kultiviert, um einen möglichen Einfluss des Fibringels zu identifizieren.

(Abbildung modifiziert nach Leyh *et al.*, 2014a, 2014b)

Dazu wurden 1×10^6 BMSC bzw. 2×10^6 Chondrozyten in 10 μ l Fibrinogen (100 mg/ml, Tab. 9) resuspendiert, mit 18 μ l Thrombin (5 U/ml) gemischt und auf Knorpel- und Knochenexplantate aufgebracht (Kokulturen) bzw. als Tropfen in eine 24-Well-Platte pipettiert (Monokulturen). Außerdem wurden je 5×10^5 BMSC und Chondrozyten in einem Fibringel gemischt und entweder alleine (Kokultur) oder auf Explantaten (Trikokultur) kultiviert. Knorpel-explantate mit zellfreiem Fibringel wurden als Kontrollen mitgeführt, um einen möglichen Einfluss des Fibringels zu identifizieren.

Nach 45 min im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) waren die Fibringele auspolymerisiert und es wurde 1 ml chondrogenes Medium (Tab. 10) pro Well zugegeben.

Die Tri-, Ko- und Monokulturen wurden für 7 und 28 Tage kultiviert und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Am Tag der Ernte wurden die Zellkulturüberstände bei -80 °C eingefroren, die Wells einmal mit PBS gewaschen und die Fibringele mit einem Spatel vom Plattenboden bzw. Knorpel- und Knochenexplantat gelöst, mit einem Skalpell zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Knorpel- und Knochenexplantate wurden ebenfalls zerkleinert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Extraktion von Proteinen gelagert. Die Knochenexplantate wurden verworfen.

Tab. 9 Fibringele

Komponente	Hersteller
fibrinogen from bovine plasma, type I-S	Sigma-Aldrich
gelöst in 0,85 % - 0,9 % NaCl-Lösung (100 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Humanes Thrombin aus TISSUCOL Duo S Immuno Kit	Baxter
verdünnt mit 40 mM CaCl ₂ -Lösung (5 U/ml)	Sigma-Aldrich

Tab. 10 Chondrogenes Differenzierungsmedium

Komponente	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (4,5 g/l), without phosphates	Gibco
1 % Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich
100 nM Dexamethason	Sigma-Aldrich
40 µg/ml L-Prolin	Sigma-Aldrich
110 µg/ml Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
50 µg/ml Ascorbat-2-Phosphat	Sigma-Aldrich
1 % ITS ⁺ -Premix	
6,25 µg/ml Insulin	
6,25 µg/ml Transferrin	BD Biosciences
6,25 µg/ml Selensäure	
1,25 µg/ml BSA	
5,35 µg/ml Linolsäure	
10 ng/ml TGF-β3	R&D Systems

3.1.6.2 Indirekte Kokultur: Micromass Pellets in konditioniertem Medium

Um den Einfluss löslicher, vom Knorpel ins Medium abgegebener Faktoren auf die chondrogene Differenzierung von BMSC zu untersuchen, wurden BMSC als Micromass Pellets in konditioniertem Medium kultiviert (indirekte Kokultur, Abb. 11). Dazu wurde eine Woche lang jeden zweiten Tag der Zellkulturüberstand von einem OA-Knorpelexplantat in 1 ml chondrogenem Medium (Tab. 10, S. 38) abgenommen und bei -80 °C eingefroren (KM). Auch das nicht-konditionierte, chondrogene Medium (NM) wurde zwei Tage lang im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert und anschließend eingefroren. 2 x 10⁵ BMSC in 200 µl Proliferationsmedium (Tab. 2, S. 33) wurden in 96-Well-Platten mit V-Boden (Nunc, ThermoFisher Scientific) 5 min bei 200xg zu einem dichten Zellpellet, einem sog. Micromass Pellet, zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde das Proliferationsmedium gegen konditioniertes (KM) bzw. nicht-konditioniertes Medium (NM) getauscht, welches alle zwei Tage erneuert wurde. Nach sieben Tagen wurde der Zellkulturüberstand von drei Micromass Pellets der gleichen Kulturbedingung gepoolt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung für die Extraktion von Kollagenen für SDS-PAGE und Western Blots eingefroren. Die Micromass Pellets wurden einmal mit PBS gewaschen und je drei Pellets gepoolt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Isolierung der RNA gelagert.

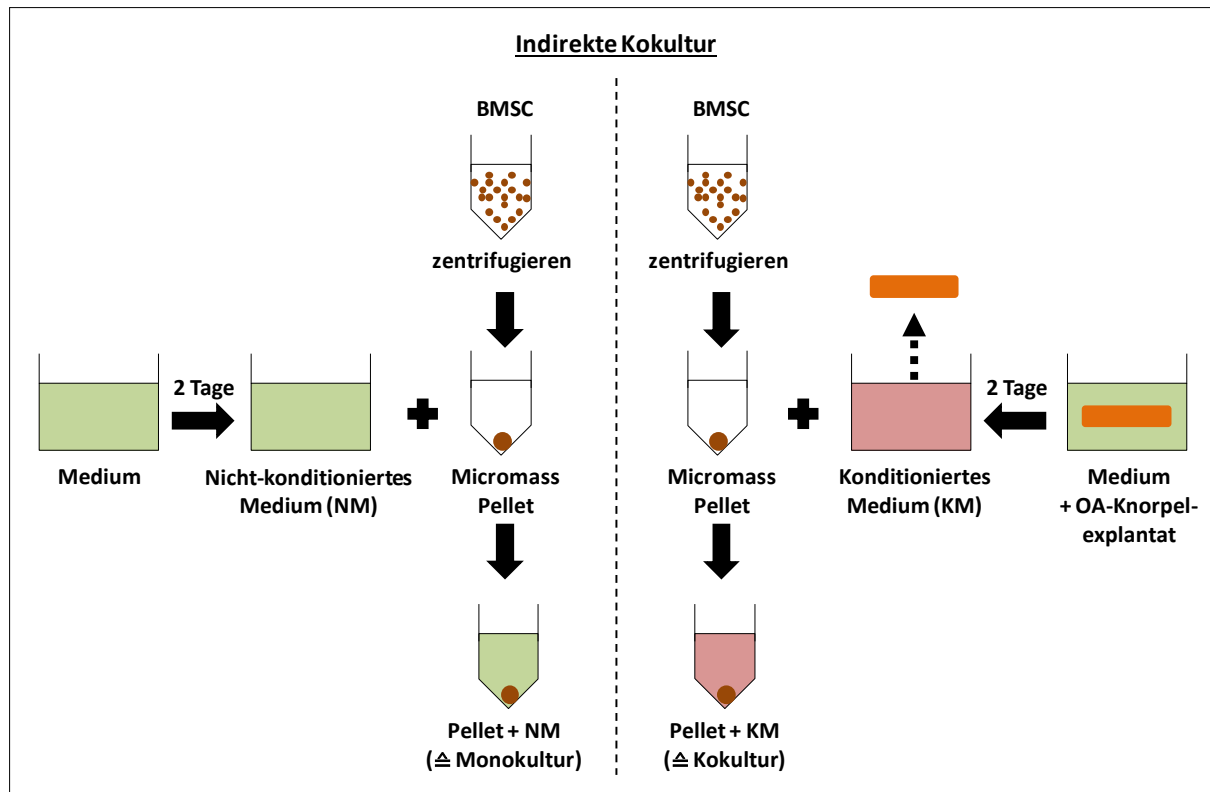


Abb. 11 Indirekte Kokultur: Micromass Pellets in konditioniertem Medium

BMSC wurden zu Micromass Pellets zentrifugiert und anschließend entweder in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert, was der Monokultur entspricht, oder in Medium, welches zuvor für zwei Tage mit einem OA-Knorpel-explantat konditioniert wurde (KM), was der Kokultur entspricht.

3.1.7 Transiente Transfektion mit miR-29b-Mimic und miR-29b-Inhibitor

24 Stunden vor der Transfektion wurden $6,5 \times 10^4$ BMSC pro Well in 6-Well-Platten bzw. 4×10^3 BMSC pro Well in 96-Well-Platten in Proliferationsmedium (Tab. 2, S. 33) ausgesät und anschließend mittels Lipofectamin transient transfiziert mit 50 nM *mirVana* miRNA Mimic von hsa-miR-29b-3p ("Mimic"), *mirVana* miRNA Mimic Negative Control #1 ("NT-miR"), *mirVana* miRNA Inhibitor von hsa-miR-29b-3p ("Inhibitor"), *mirVana* miRNA Inhibitor Negative Control #1 ("NT-miR") oder BLOCK-iT Alexa Fluor Red Fluorescent Control ("Fluoreszenzkontrolle"). Bei den Negativkontrollen handelt es sich um miR-Moleküle mit einer zufälligen Sequenz. Das Mimic ist eine kurze, doppelsträngige RNA, die die endogene miR-29b nachahmt. Der Inhibitor hingegen ist ein kurzes, einzelsträngiges RNA-Molekül, das speziell designiert wurde, um an endogene miR-29b-Moleküle zu binden und diese zu inhibieren, sodass die Aktivität der miR, an ihre Ziel-mRNA zu binden, gehemmt wird. Bei der Fluoreszenzkontrolle handelt es sich um eine Alexa Fluor-555-gelabelte, doppelsträngige RNA, die dazu diente, die Transfektionseffizienz zu optimieren.

Entsprechend dem Reaktionsansatz in Tab. 11 wurden zunächst separat die RNA-Moleküle bzw. das Lipofectamin mit Medium gemischt, anschließend beide Ansätze vereint, 5 min bei RT inkubiert, mit Medium aufgefüllt und dann 1 ml bzw. 67,2 µl pro Well auf die BMSC in 6- bzw. 96-Well-Platten pipettiert. Nach 24 h im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und die Zellen entsprechend den unten aufgeführten Versuchen weiterkultiviert. BMSC, die mit dem fluoreszierenden RNA-Oligonukleotid transfiziert wurden, wurden durch ein Fluoreszenzmikroskop (Nicon Eclipse TE2000-U) betrachtet und die Transfektionseffizienz auf nahezu 100 % geschätzt. BMSC, die in 6-Well-Platten mit Mimic/NT-miR transfiziert und anschließend in chondrogenem Medium weiterkultiviert wurden, wurden nach 48 h für RNA Isolierung (2 Wells) und nach 72 h für Proteinextraktion (3 Wells) geerntet. BMSC, die in 6-Well-Platten mit Inhibitor/NT-miR transfiziert wurden, wurden 24 h nach der Transfektion abtrypsiniert (Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich), zu Micromass Pellets zentrifugiert (Abschn. 3.1.6.2, S. 39), für 7 Tage in konditioniertem Medium kultiviert und anschließend bei -80 °C für die spätere RNA-Isolierung eingefroren. Mit BMSC, die in 96-Well-Platten mit Mimic/Inhibitor/NT-miR transfiziert wurden, wurde ein Caspase-3/7-Aktivitätsassay (Abschn. 3.3.10, S. 65) bzw. ein BrdU-Inkorporationsassay (Abschn. 3.3.9, S. 63) durchgeführt, um den Einfluss von miR-29b auf Apoptose bzw. Proliferation zu analysieren.

Tab. 11 Transfektionsansatz

Komponente	Volumen pro 6-Well	Volumen pro 96-Well	Hersteller
Ansatz A			
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	147,5 µl	10,2 µl	Gibco
Mimic, Inhibitor, NT-miR, Fluoreszenzkontrolle (20 µM)	2,5 µl	0,168 µl	Ambion
Ansatz B			
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	141 µl	10,2 µl	Gibco
Lipofectamine RNAiMAX Reagent	9 µl	0,606 µl	Invitrogen
A und B vereinen, 5 min bei RT inkubieren			
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	700 µl	46,026 µl	Gibco
+ 10 % FCS			Sigma-Aldrich

3.1.8 Inhibition und Stimulation der miR-29b-Expression

Um Faktoren zu identifizieren, die für die Hochregulation der miR-29b-Expression, induziert durch konditioniertes Medium, verantwortlich sind, wurden Inhibitions- und Stimulationsexperimente durchgeführt.

BMSC kultiviert als Micromass Pellets wurden in KM gehalten, dem Protease-inhibitorcocktails mit und ohne EDTA (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) zugesetzt wurde, um zu analysieren, ob die Induktion der miR-29b-Expression durch Inhibition von Proteasen wie MMPs verhindert werden kann. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Pellets nach sieben Tagen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C eingefroren.

BMSC kultiviert als Micromass Pellets wurden mit verschiedenen Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen (Tab. 12) in chondrogenem Medium stimuliert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, nach sieben Tagen die RNA isoliert und anschließend die Expression von miR-29b, *COL1A1* und *COL3A1* analysiert.

Tab. 12 Stimulation von BMSC mit verschiedenen Zytokinen

Komponente	Konzentrationen	Hersteller
IL-6	0,5 ng/ml; 1 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml	Peprtech
IL-1 β	1 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml	Peprtech
IL-8	10 ng/ml	Peprtech
LIF	1 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml	Peprtech
TNF- α	10 ng/ml	Peprtech
IFN- γ	1 ng/ml; 10 ng/ml; 50 ng/ml	Peprtech
Gemisch I (IL-6 + IL-1 β)	5 ng/ml + 5 ng/ml	
Gemisch II (IL-1 β + IL-8 + TNF- α)	5 ng/ml + 10 ng/ml + 10 ng/ml	

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA einschließlich der miRNA-Fraktion wurde aus Zellen in Monolayer mit dem *Absolutely RNA miRNA Kit* (Agilent) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Für Zellen in Fibringelen und Micromass Pellets wurde das *MasterPure Complete RNA Purification Kit* (Epicentre) verwendet und das Protokoll für Gewebeproben einschließlich Proteinase K- und DNase I-Behandlung befolgt. Zu

Beginn wurden die Zell-Fibringele und Micromass Pellets mit Hilfe eines Mikropistills (Eppendorf) in Lysepuffer (300 µl *Tissue and Cell Lysis Solution* + 2 µl Proteinase K pro Fibringel bzw. 3 Micromass Pellets) homogenisiert. Das isolierte RNA-Pellet wurde schließlich in RNase-freiem Wasser (Appllichem) resuspendiert.

3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) ermittelt. Hierbei wird für Nukleinsäuren die Extinktion der Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Aufgrund der unterschiedlichen Extinktionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen liefert die Extinktionsmessung auch eine erste Aussage über die Reinheit der RNA. Nukleinsäuren haben ihr Extinktionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Der Quotient von 260/280 lässt Rückschlüsse auf Kontamination der RNA-Probe mit Proteinen zu. Reine RNA sollte 260/280-Werte von ca. 2 aufweisen, kleinere Werte deuten auf Proteine in der Probe hin. Als weiterer Indikator für die Reinheit der RNA wird der 260/230-Wert bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte. Niedrigere Werte deuten auf Reste von Chemikalien mit einem Extinktionsmaximum bei 230 nm hin, wie z. B. Phenol oder Guanidin-HCl, die in vielen Puffern der RNA-Isolierungskits enthalten sind. Da diese Werte nur einen ersten Hinweis auf die Reinheit der RNA, aber keine Aussagen über die Qualität wie Degradationsgrad geben, wurden die RNA-Proben anschließend noch in einem automatisierten Elektrophoresesystem (Bioanalyzer, Agilent) getestet.

3.2.3 Überprüfung der RNA-Qualität

Die Qualität der Gesamt-RNA wurde mit dem RNA 6000 Nano Kit im Bioanalyzer 2100 (Agilent) überprüft. Im Bioanalyzer werden denaturierte RNA-Proben auf einem Chip durch Mikrokapillar-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und durch das Einlagern eines Fluoreszenzfarbstoffs zwischen die RNA-Basen detektiert. Die Software kreiert ein sog. Elektropherogramm, bei dem die Fluoreszenzintensität gegen die Migrationszeit aufgetragen wird. Im Elektropherogramm erhält man für intakte RNA zwei Peaks (18S und 28S rRNA). Die Software konvertiert die Daten des Elektropherogramms in densitometrische Banden, um ein virtuelles Gelbild zu erzeugen. Anhand der detektierten Fluoreszenz wird auch die RNA-Qualität bestimmt. Dazu wird durch einen Algorithmus ein sog. RIN-Wert (RNA integrity number) generiert, der die Messdaten der Probe mit einer Serie standardisierter, degradierter

RNAs vergleicht. RIN-Werte liegen zwischen 1 und 10, wobei 10 für intakte, unfragmentierte RNA hoher Qualität steht und 1 für komplett degradierte RNA. Der RIN-Wert für RNA, die aus Zellen in Monolayer isoliert wurde, lag zwischen 10 und 8, für RNA aus Zellen in Fibringelen und Micromass Pellets lagen die RIN-Werte meist über 7, teilweise auch bei 5-6. RNAs mit RIN-Werten < 5 wurden verworfen.

Um die Extraktionseffizienz der microRNA-Fraktion bei der Isolierung der Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde das *Small RNA Kit* für den Bioanalyzer verwendet. Hier zeigen sich im Elektropherogramm drei Bereiche: direkt hinter dem Marker-Peak kommt die miRNA-Region, an die sich ein großer, breiter Peak der tRNAs anschließt, dem mehrere Peaks für kleine rRNAs folgen. In allen stichprobenartig untersuchten Gesamt-RNA-Proben tauchte der miR-Peak auf.

3.2.4 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) lässt sich RNA (mRNA, microRNA) in cDNA umschreiben, die anschließend mittels PCR amplifiziert und quantifiziert werden kann. Bei der RT handelt es sich um eine DNA-Polymerase, die ausgehend von einer einzelsträngigen RNA eine dazu komplementäre doppelsträngige DNA synthetisiert. Da die RT als Startpunkt eine kurze, doppelsträngige Sequenz braucht, wurden Oligo dT Primer, die am Poly-A-Schwanz der mRNA binden, und/oder random Hexamer Primer eingesetzt, die aus einer zufälligen Folge der vier verschiedenen DNA-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin bestehen und an jeder komplementären Stelle an die RNA binden. Reife microRNAs (~ 20 nt) sind zu kurz für den Einsatz herkömmlicher Primer. Deshalb wurden hier bei der cDNA-Synthese spezifische Schleifen-Primer (stem-loop primer) eingesetzt, die am 3'-Ende binden und selektiv das Umschreiben reifer miRs ermöglichen.

3.2.4.1 miRs

Für die Expressionsanalyse von miRs wurden 10 ng RNA in einem 15 µl-Ansatz (Tab. 13) mit dem *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) und den entsprechenden RT-Primern der TaqMan MicroRNA Assays (Tab. 14) in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra) in cDNA umgeschrieben. Bevor die Proben in den Thermocycler gestellt und die Reaktion (Tab. 15) gestartet wurde, wurden sie 5 min auf Eis inkubiert.

Tab. 13 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese (miRs)

Komponente	Volumen
dNTPs	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
Reverse Transcription Buffer	1,5 µl
RNase Inhibitor	0,19 µl
Nuclease-free water	4,16 µl
RT Primer	3 µl
RNA (2 ng/µl)	5 µl

Tab. 14 TaqMan MicroRNA Assays

miRBase ID	TaqMan MicroRNA Assay	Assay ID
hsa-miR-124-3p	mmu-miR-124a	001182
hsa-miR-675-5p	hsa-miR-675	002005
hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-29b	000413
hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-301	000528
	U6 snRNA	001973

Tab. 15 Programm für die cDNA-Synthese (miRs)

Schritt	Dauer	Temperatur
Primer Annealing	30 min	16 °C
Elongation	30 min	42 °C
Inaktivierung	5 min	85 °C
	∞	4 °C

3.2.4.2 Potentielle Zielgene

Für die Expressionsanalyse potentieller Zielgene der miRs wurden 400 ng RNA in einem 20 µl-Ansatz (Tab. 16) mit dem *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* (Agilent) in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra) in cDNA umgeschrieben. Der erste Schritt der Reaktion, die Anlagerung der Primer an die mRNA, erfolgte für 5 min bei 25 °C, die Synthese der komplementären DNA durch die Reverse Transkriptase erfolgte für 15 min bei 42 °C, bevor das Enzym im abschließenden Schritt durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min inaktiviert wurde. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C eingefroren.

Tab. 16 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese (Zielgene)

Komponente	Volumen
cDNA Synthesis Master Mix	10 µl
Oligo(dT) Primer	1,5 µl
Random Nonamers	1,5 µl
AffinityScript RT/ RNase Block Enzyme Mixture	1 µl
RNA (400 ng)	X µl
RNase-free H ₂ O	6 µl - X µl

3.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mittels qPCR lässt sich mRNA quantifizieren und somit die Genexpression verschiedener Proben untereinander vergleichen. Bei dieser Methode kommt es wie bei der Endpunkt-PCR durch spezifische Primer zu einer exponentiellen Amplifikation eines bestimmten cDNA-Templates, wobei nach jedem Zyklus sozusagen in Echtzeit die Zunahme an PCR-Produkt durch Fluoreszenzmessungen aufgezeichnet wird. Neben unspezifischen DNA-Farbstoffen wie z.B. SYBR Green, dessen Fluoreszenz bei Interkalation in doppelsträngige DNA ansteigt, werden auch spezifische Sonden eingesetzt, die den Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ausnutzen. TaqMan-Sonden sind lineare Oligonukleotide mit einem Quencher am 3'-Ende und einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. FAM am 5'-Ende. Die Sonde ist komplementär zu einer Sequenz zwischen den Primer-Bindestellen des Amplikons und wenn die Sonde gebunden hat, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Während der Elongation spaltet die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität besitzt, das Fluorophor ab, wodurch es zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt. Somit kann nach jedem Zyklus die Zunahme an PCR-Produkt durch den Anstieg der Fluoreszenz von SYBR Green oder FAM nach entsprechender Anregung gemessen werden.

Theoretisch sollte jeder Zyklus zu einer Verdopplung des Templates führen und somit zu einem doppelt so hohen Fluoreszenzsignal. Eine PCR verläuft jedoch in verschiedenen Phasen (Abb. 12). Aufgrund der anfangs geringen Konzentration des Templates ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass DNA, Primer und Polymerase zusammentreffen, was zu geringen Amplifikationsraten führt. Deshalb ist das

Fluoreszenzsignal zu schwach, um sich vom Hintergrund abzusetzen. Nach ein paar Zyklen ist genug Produkt entstanden, um eine merkbar schnellere DNA-Amplifikation zu erreichen (exponentielle Phase). Am Ende führen mehrere Faktoren, wie z.B. Mangel an dNTPs, Inaktivierung der Polymerase oder Produktinhibitor, dazu, dass die Amplifikationsrate sich abschwächt und ein Plateau erreicht. Um die anfänglich in verschiedenen Proben enthaltenen Mengen an Template zu vergleichen, wird der sog. CT-Wert (threshold cycle) ermittelt. Dieser Wert reflektiert die Anzahl der Amplifikationszyklen, die nötig waren, die Schwelle zu erreichen, an der das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt. D.h. ein kleinerer CT-Wert bedeutet eine anfänglich höhere Template-Menge, da der Schwellenwert früher erreicht wird. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte relativ nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode mit den jeweils angegebenen Kontrollen als Kalibrator und GAPDH bzw. U6 als Normalizer. Expressionslevel sind als \log_2 -fache Änderungen relativ zu den angegebenen Kontrollen dargestellt.

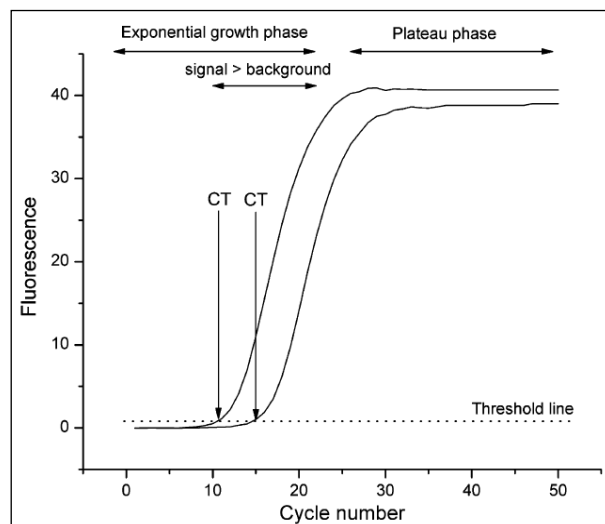


Abb. 12 qPCR-Amplifikationskurven

Anfangs ist das Fluoreszenzsignal zu schwach, um sich vom Hintergrund abzuheben, dann nimmt es exponentiell zu und erreicht schließlich ein Plateau. Der sog. CT-Wert reflektiert die Anzahl der Amplifikationszyklen, die nötig war, den Schwellenwert zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt. D.h. ein kleinerer CT-Wert bedeutet eine anfänglich höhere Template-Menge, da der Schwellenwert früher erreicht wird. (Abbildung aus **Kubista et al., 2006**)

3.2.5.1 miRs

Die Expressionslevel verschiedener miRs wurden durch qPCR mittels TaqMan Assays in 20 µl-Ansätzen (Tab. 17) in Duplikaten in 96-Well-Platten im Mx3005P QPCR System von Agilent Technologies untersucht. Nach Beendigung der Reaktion (Tab. 18) wurden die CT-Werte mit Hilfe der MxPro Software (Stratagene) ermittelt,

der Mittelwert aus den Duplikaten gebildet und die Werte nach Microsoft Excel exportiert. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode relativ zu der jeweiligen Kontrolle gemäß der entsprechend umgestellten Formel

$$RQ = \frac{2^{(CT_{GOI}(\text{calibrator}) - CT_{GOI}(\text{unknown}))}}{2^{(CT_{Norm}(\text{calibrator}) - (CT_{Norm}(\text{unknown})))}}$$

die sich ergibt aus

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[\Delta CT(\text{unknown}) - \Delta CT(\text{calibrator})]}$$

mit $\Delta CT(\text{unknown}) = CT_{GOI}(\text{unknown}) - CT_{Norm}(\text{unknown})$

und $\Delta CT(\text{calibrator}) = CT_{GOI}(\text{calibrator}) - CT_{Norm}(\text{calibrator})$

RQ: *relative quantification*; gibt das Vielfache der Änderung zum Kalibrator an, der einen RQ-Wert von 1 hat.

CT: *threshold cycle*; Anzahl der benötigten Amplifikationszyklen, um den Schwellenwert zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal übersteigt.

GOI: *gene of interest*; das untersuchte Gen, z.B. die miR oder das Zielgen

NORM: *normalizer*; Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle (U6 snRNA für miRs und GAPDH für Zielgene)

calibrator: Kontrolle, mit der alle anderen Proben verglichen werden, z.B. Monokultur, unstimuliert

unknown: Probe, die relativ zum Kalibrator in Bezug gestellt werden soll, z.B. Kokultur, stimuliert

Anschließend wurde der Logarithmus von RQ zur Basis 2 gebildet. Die Expressionslevel sind somit als \log_2 -fache Änderungen relativ zu den angegebenen Kontrollen (0-Linie) als Boxplots dargestellt, mit Median, 25. und 75. Perzentile und Whiskern, die den kleinsten und größten Wert markieren.

Tab. 17 Reaktionsansatz für qPCR (miRs)

Komponente	Volumen
TM Primer	1 µl
Produkt der RT Reaktion	1,33 µl
Universal PCR Master Mix II, No AmpErase UNG	10 µl
Nuklease-freies H ₂ O	7,67 µl

Tab. 18 Programm für qPCR (miRs)

Schritt	Temp.	Dauer	Zyklusanzahl
Enzymaktivierung	50 °C	2 min	1
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Elongation	60 °C	1 min	40

3.2.5.2 Potentielle Zielgene

Die Expressionslevel verschiedener potentieller Zielgene der untersuchten miRs wurden mittels qPCR mit SYBR Green analysiert. Dazu wurden 20 ng cDNA, *Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix* (Agilent), 200 nM selbst-designte Primer (Microsynth, Tab. 19) in einem 25 µl-Ansatz (Tab. 20) in Duplikaten in 96-Well-Platten pipettiert und das in Tab. 21 aufgeführte Programm im Mx3005P QPCR Gerät laufen lassen. Die Auswertung erfolgte analog wie unter 3.2.5.1 (S. 47) für miRs beschrieben.

Tab. 19 Primersequenzen für die qPCR (Zielgene)

Gen	Primersequenz
<i>COL1A1</i>	fwd: 5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3' rev: 5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'
<i>COL2A1</i>	fwd: 5'-TGCTGCCCAGATGGCTGGAGGA-3' rev: 5'-TGCCTTGAAATCCTTGAGGCCC-3'
<i>COL3A1</i>	fwd: 5'-CTTCTCTCCAGCCGAGCTTC-3' rev: 5'-TGTGTTTCGTGCAACCATCC-3'
<i>SOX9</i>	fwd: 5'-ACACACAGCTCACTCGACCTTG-3' rev: 5'-AGGGAATTCTGGTTGGTCCTCT-3'
<i>CTGF</i>	fwd: 5'-CTCGCGGCTTACCGACTG-3' rev: 5'-GGCTCTGCTTCTCTAGCCTG-3'
<i>BCL2</i>	fwd: 5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3' rev: 5'-ACAGTTCCACAAAGGCATCC-3'
<i>MCL1</i>	fwd: 5'-AAGCCAATGGGCAGGTCT-3' rev: 5'-TGTCCAGTTTCCGAAGCAT-3'
<i>GAPDH</i>	fwd: 5'-CTGACTTCAACAGCGACACC-3' rev: 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-3'

Tab. 20 Reaktionsansatz für qPCR (Zielgene)

Komponente	Volumen
Brilliant II SYBR Green QPCR master mix	12,5 µl
Forward Primer	0,5µl
Reverse Primer	0,5 µl
ROX Reference Dye	0,375 µl
cDNA (20 ng/µl)	5 µl
Nuclease-free H ₂ O	6,125 µl

Tab. 21 Programm für qPCR (Zielgene)

Schritt	Temp.	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1
Denaturierung	95 °C	10 s	40
Elongation	60 °C	30 s	40
	95 °C	1 min	1
Schmelzkurve	55 °C	30 s	1
	95 °C	30 s	1

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Proteinextraktion

3.3.1.1 Proteinextraktion aus Knorpelimplantaten

Um zu untersuchen, ob die kokultivierten Zellen einen Einfluss auf den Knorpelmetabolismus haben, wurden aus den Knorpelimplantaten Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinextraktion aus Knorpelimplantaten erfolgte durch eine Kombination aus physikalischen, enzymatischen und chemischen Methoden (Abb. 13) nach folgendem Protokoll basierend auf Arbeiten von Wilson *et al.* (Belluoccio *et al.*, 2006; Wilson und Bateman, 2008; Wilson *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2012). Zunächst wurden die Fibringele (zellfrei bzw. mit BMSC, Chondrozyten oder einem Gemisch beider Zelltypen) mit einem Spatel vom Implantat gelöst, der Knorpel einmal mit PBS gewaschen, mit einem Skalpell zerkleinert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren und entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert. Das Knorpelimplantat wurde zwei- bis dreimal für 30 s bei einer Schwingungsfrequenz von 3.000 ¹/min mit dem Mikro-Dismembrator S (B. Braun Biotech International) pulverisiert und nach jedem Durchgang in flüssigem Stickstoff wieder herabgekühlt. 100 mg Knorpelpulver wurden in 1 ml Deglykosylierungspuffer mit Chondroitinase (Tab. 22) für 6 h bei 37 °C im Rotator inkubiert. Nach der Deglykosylierung erfolgte die erste Extraktion von Proteinen mit 1 M NaCl durch Zugabe von 1 ml NaCl-Extraktionspuffer (Tab. 23) und Inkubation für 24 h bei 4 °C im Rotator. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (20 min, 13.000xg, 4 °C) und Proteine aus dem erhaltenen Pellet durch eine zweite Extraktion mit 4 M GdnHCl durch Zugabe von 1 ml GdnHCl-Extraktionspuffer (Tab. 24) und Inkubation für 24 h bei 4 °C im Rotator extrahiert. Aus dem Überstand mit der NaCl-löslichen Proteinfraction wurden die Proteine mit Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt, abzentrifugiert (20 min, 10.000xg, 4 °C), zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen, nach dem Trocknen in Resolubilisierungspuffer (Tab. 25) gelöst und bei -20 °C eingefroren. Die GdnHCl-unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 13.000xg, 4 °C), das Pellet verworfen und die Proteine aus dem Überstand wurden entweder analog wie die NaCl-lösliche Proteinfraction mit Ethanol gefällt, gewaschen und in Resolubilisierungspuffer gelöst oder entsprechend ihrem Molekulargewicht noch weiter fraktioniert. Dazu wurde der Überstand mit der GdnHCl-löslichen Proteinfraction durch Zentrifugation in Amicon 100 kDa Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore) filtriert. Das Filtrat enthielt Proteine mit

einem Molekulargewicht unter 100 kDa, das Retentat entsprechend die größeren Proteine. Aus beiden Fraktionen wurden die Proteine wie oben beschrieben gefällt, und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

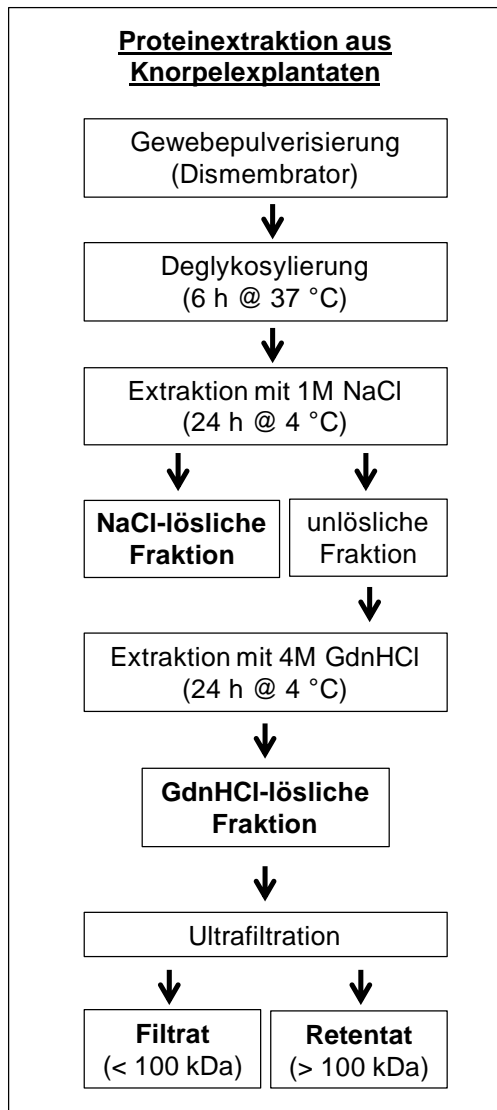


Abb. 13 Sequentielle Proteinextraktion aus Knorpel-explantaten

Die Proteinextraktion aus Knorpel-explantaten erfolgte physikalisch durch Pulverisierung mit einem Dismembrator, enzymatisch durch Deglykosylierung mit Chondroitinase und chemisch mit NaCl und GdnHCl. Die GdnHCl-lösliche Proteinfraction wurde z.T. mittels Ultrafiltration noch in Proteine größer bzw. kleiner 100 kDa aufgetrennt.

(Abbildung modifiziert nach **Wilson et al., 2012**)

Tab. 22 Deglykosylierungspuffer

Komponente	Hersteller
100 mM Tris-Acetat	Carl Roth
10 mM EDTA	Applichem
0,1 U/ml Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich
auf pH 8 einstellen	

Tab. 23 NaCl-Extraktionspuffer

Komponente	Hersteller
1 M NaCl	Carl Roth
100 mM Tris-Acetat	Carl Roth
auf pH 8 einstellen	

Tab. 24 GdnHCl-Extraktionspuffer

Komponente	Hersteller
4 M GdnHCl	Applichem
65 mM DTT	Applichem
10 mM EDTA	Applichem
50 mM Natrium-Acetat	Carl Roth

auf pH 5.8

Tab. 25 Resolubilisierungspuffer

Komponente	Hersteller
6 M Urea	Merck
2 % SDS	Carl Roth

3.3.1.2 Proteinextraktion aus Zellen in Monolayer und Fibringelen

Um Proteine aus transfizierten BMSC in Monolayer-Kultur zu extrahieren, wurden die 6-Wells einmal mit PBS gewaschen, die Zellen abtrypsiniert, BMSC aus drei Wells gepoolt und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 70 µl RIPA-Puffer (Pierce, Thermo Fisher Scientific) mit Proteaseinhibitor (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch immer wieder gevortext. Nach der Ultraschallbehandlung (3 x 20 s mit 5 Zyklen und 50 % Amplitude, SONOPULS Ultraschallhomogenisator, Bandelin) wurden die Zelllysate bei 4 °C mit 13.000xg für 15 min zentrifugiert und der klare Überstand mit den löslichen Gesamtproteinen für Western Blotting weiterverwendet.

Um Proteine aus Zellen in Fibringelen zu extrahieren, wurden die Fibringele vom Explantat gelöst, mit einem Skalpell zerkleinert und in 150 µl RIPA-Puffer einschließlich Proteaseinhibitor auf Eis inkubiert und immer wieder gevortext. Anschließend wurden die Lysate beschallt (3 x 30 s mit 5 Zyklen und 50 % Amplitude), wie oben beschrieben zentrifugiert und der klare Überstand für Western Blotting und ELISA weiterverwendet.

3.3.1.3 Kollagenextraktion aus Zellkulturüberstand

Aus Zellkulturüberständen von Fibringelen in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten bzw. von Micromass Pellets in KM und NM wurden Pepsin-resistente, fibrilläre Kollagene extrahiert. Entsprechende Volumina an Zellkulturüberstand, die 1-5 mg Gesamtprotein enthielten, wurden mit 100 µl Pepsinpuffer (Tab. 26) pro Milliliter Zellkulturüberstand für 48 h bei 4 °C im Rotationsmischer inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Lysate mit 1 M Tris (Applichem) neutralisiert und der pH-Wert von 7 mit pH-Papier (Macherey-Nagel) überprüft. Anschließend wurden die Pepsin-resistenten Kollagene durch Zugabe von NaCl (Carl Roth) bis zu einer

Endkonzentration von 4,5 M über Nacht bei 4 °C im Rotationsmischer extrahiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (30 min, 14.000xg, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl Präzipitationspuffer (Tab. 27) resuspendiert und die Kollagene durch Zugabe von 300 µl Ethanol (Sigma-Aldrich) über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Anschließend wurden die Proteine pelletiert (30 min, 14.000xg, 4°C), getrocknet und in RIPA-Puffer (Pierce) für das Western Blotting resuspendiert.

Tab. 26 Pepsinpuffer

Komponente	Hersteller
5 mg/ml Pepsin	Sigma-Aldrich
0,5 M Essigsäure	Carl Roth
0,2 M NaCl	Carl Roth

Tab. 27 Präzipitationspuffer

Komponente	Hersteller
0,4 M NaCl	Carl Roth
0,1 M Tris	Applichem
pH 7.4	

3.3.2 BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate bzw. des Zellkulturüberstands wurde mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Diese Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, wobei Proteine in alkalischem Medium die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} katalysieren. Das einwertige Kupferion wird anschließend von zwei Bicinchoninsäuremolekülen (BCA) gebunden und bildet einen wasserlöslichen violetten Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Anhand einer Standardkurve, für die die gemessenen Absorptionswerte gegen die bekannten Konzentrationen eines Proteins wie z.B. BSA aufgetragen werden, kann die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden. Entsprechend den Herstellerangaben wurden BSA-Standards zwischen 0-2.000 µg/ml hergestellt, 10 µl Standard oder Probe in einer 96-Well-Platte in Duplikaten pipettiert und mit 200 µl *Working Reagent* gemischt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Absorption bei 560 nm in einem ELISA-Reader (Tecan GENios) gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand einer linearen Standardkurve in µg/ml bestimmt.

3.3.3 SDS-PAGE

Proteine können mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Damit Konformation und Eigenladung der Proteine keine Rolle bei der Auftrennung nach Proteingröße spielten, wurden die Proteine gleichmäßig negativ geladen, denaturiert und reduziert. Dazu wurden die

Proteinlysate mit Ladepuffer (Tab. 28) versetzt, der u.a. SDS und Dithiothreitol (DTT) enthält. SDS, ein anionisches Detergens, bindet mit einem konstanten Massenverhältnis an Proteine, deren Eigenladung durch die negative Ladung des SDS überdeckt wird. DTT reduziert Disulfid-Brücken und zusammen mit der Hitze-denaturierung führt dies zum Verlust der Tertiär- und Sekundärstruktur, sodass die Proteine als lineare Polypeptidketten vorliegen und beim Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Länge unterschiedlich schnell durch ein Polyacrylamidgel in Elektrophoresepuffer (Tab. 29) mit geeigneten Elektrolyten zur Anode migrieren. Durch den Acrylamidgehalt lassen sich die Trenneigenschaften des Gels variieren: für kleine Proteine, die relativ leicht durch die Maschen des Gels wandern, empfiehlt sich ein Gel mit einem höheren Acrylamidgehalt und für große Proteine dementsprechend ein grobmaschigeres Gel. Heterogene Proteingemische lassen sich mit Gradientengelen auftrennen, die durch einen kontinuierlich ansteigenden Acrylamidanteil einen großen Trennbereich aufweisen.

Tab. 28 SDS-Ladepuffer

Komponente	Hersteller
60 mM Tris, pH 6.8	Applichem
10 % Glycerin	Carl Roth
2 % SDS	Carl Roth
0,1 M DTT	Applichem
0,002 % Bromphenolblau	Sigma-Aldrich

Tab. 29 Elektrophoresepuffer

Komponente	Hersteller
192 mM Glycin	Carl Roth
25 mM Tris	Applichem
0,1 % SDS	Carl Roth

3.3.3.1 Proteinextrakte aus Knorpelexplantaten

30 µg jeder Fraktion der Proteinextrakte aus Knorpelexplantaten wurden mit Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte in selbstgegossenen 4,5 - 15 % Maxi-Gradientengelen (Tab. 30) in einer von der Mechanik-Werkstatt der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg gebauten Elektrophoresekammer bei 120 V für ca. 6 h. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Coomassie- bzw. Silberfärbung sichtbar gemacht (Abschn. 3.3.5, S. 58).

Tab. 30 Zusammensetzung der Maxi-Gradientengele

Komponente	Volumen für Trenngel (4,5 %)	Volumen für Trenngel (15 %)	Hersteller
1,5 M Tris (pH 8.8) + 10 % SDS	3,9 ml	3,9 ml	Applichem/Roth
Acrylamid-Bis 30% (37,5:1)	2,25 ml	7,5 ml	Carl Roth
TEMED	11,25 µl	11,25 µl	Carl Roth
10 % Ammoniumpersulfat	112,5 µl	112,5 µl	Serva
H ₂ O	8,75 ml	3,5 ml	
Gesamtvolumen	15 ml	15 ml	

3.3.3.2 Proteinlysate aus Zellen in Monolayer und Fibringelen

Je nach Expression und Größe des Zielproteins wurden entsprechende Mengen an Proteinlysat mit Ladepuffer versetzt, denaturiert und auf selbstgegossene Polyacrylamidgele aufgetragen (Tab. 31). Die Auftrennung erfolgte bei 100-120 V in einer Elektrophoresekammer von Bio-Rad (Mini-PROTEAN Tetra Cell) für ca. 2 h.

Tab. 31 Bedingungen für die Elektrophorese

Protein	Eingesetzte Proteinmenge	Denaturierung	Acrylamidkonzentration des Trenngels
Sox 9/β-Aktin	20 µg	5 min, 95 °C	10 %
Collagen I	20 µg	10 min, 95 °C	8 %
Collagen III	40 µg	10 min, 95 °C	8 %

3.3.3.3 Kollagenextrakte aus Zellkulturüberstand

Das gesamte Kollagenlysate, das aus Zellkulturüberstand extrahiert wurde, der 1 - 5 mg Gesamtprotein enthielt, wurde auf 8 % Polyacrylamidgele aufgetragen und bei 100-120 V in der Elektrophoresekammer von Bio-Rad in ca. 2 h aufgetrennt.

3.3.4 Western Blotting

Wie DNA und RNA können auch Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Membran übertragen, d.h. geblottet, werden. Der Transfer der Proteine kann über Diffusion, Kapillarwirkung oder per Elektrophorese erfolgen. Bei der elektrophoretischen Übertragung wird, anders als bei der SDS-PAGE, nun senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld angelegt, die negativ geladenen Proteine wandern wieder zum Pluspol und somit aus dem Gel auf eine Membran aus Nitrocellulose oder

Polyvinylidenfluorid (PVDF), wo sie durch ionische bzw. hydrophobe Wechselwirkungen gebunden bleiben. Auf der Membran kann dann ein bestimmtes Protein durch einen spezifischen Antikörper detektiert werden. Um unspezifische Signale zu minimieren, werden freie Bindestellen auf der Membran mit Proteinen aus einer Blocklösung z.B. aus Milch oder BSA abgesättigt. An einen zweiten Antikörper, der gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichtet ist, ist z.B. eine Peroxidase gekoppelt. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, was zur Emission von Licht führt, wenn oxidiertes Luminol vom angeregten Zustand in den Grundzustand zurückfällt (Abb. 14). Dieses per Chemilumineszenz entstandene Lichtsignal kann mittels einer Kamera aufgezeichnet werden und somit die Proteinbande detektiert werden.

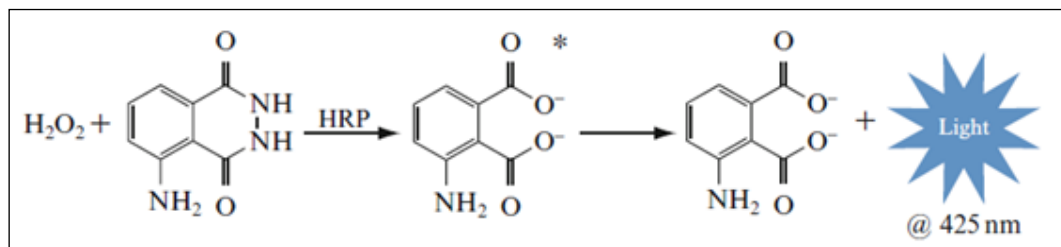


Abb. 14 Reaktionsschema der Oxidation von Luminol

Die Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das Produkt dieser Reaktion, 3-Aminophthalat, emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm, wenn es vom angeregten Zustand (*) in den Grundzustand zurückfällt. (Abbildung aus **Alegria-Schaffer et al., 2009**)

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele für 30 min in Transferpuffer (Tab. 32) äquilibriert, um Reste des Elektrophoresepuffers und Salze zu entfernen, wodurch die Hitzeentwicklung während des Transfers durch übermäßiges Ansteigen der Leitfähigkeit verringert wird. Außerdem wurde durch das Voräquilibrieren die SDS-Konzentration im Gel verringert, was die Gefahr des Durchblottens durch Nitrocellulose-Membranen senkte. Weiterhin nimmt das Gel beim Äquilibrieren seine endgültige Größe an, wodurch das Schwellen des Gels während des Transfers, was zu unscharfen Banden führt, verhindert wird. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde die *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* von Bio-Rad benutzt, die mit Transferpuffer gefüllt wurde und in die ein Kühlakku eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde die gesamte Apparatur in eine Box mit Eis gestellt. Je nach *protein of interest* variierten Membran, Blotzeit und eingestellte Stromstärke (Tab. 33).

Tab. 32 Transferpuffer

Komponente	Hersteller
192 mM Glycin	Carl Roth
25 mM Tris	Appllichem
5 - 10 % Methanol	Merck
pH 8.3	

Tab. 33 Bedingungen für den Proteintransfer

Protein	Transfer	Membran
Sox9	120 mA, 1 h 20 min, auf Eis	Nitrocellulose (0,45 µm)
Kollagen I	90 mA, 4 h, auf Eis	PVDF (0,2 µm)
Kollagen III	90 mA, 4 h, auf Eis	PVDF (0,2 µm)

Nach dem Blotten wurde der erfolgreiche Transfer durch das Anfärben der Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Färbelösung (Sigma-Aldrich) überprüft, fotografiert und die rot gefärbten Proteinbanden anschließend mit TBS-T (Tab. 34) wieder entfernt. Um zurückgebliebene Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Blotten mit Coomassie-Blau gefärbt, entwässert und getrocknet (Abschn. 3.3.5, S. 58). Die Membranen wurden für 1 h bei RT in Blocklösung (Tab. 35) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindestellen zu blocken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tab. 36) in Blocklösung bei 4 °C über Nacht und nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für je 10 min folgte der Sekundärantikörper in Blocklösung für 1 h bei RT. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Membranen 5 min bei RT mit *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (ThermoScientific) inkubiert und die Chemilumineszenz im Chemi-Smart 5000 (PeqLab) mit der Software Chemi-Capt 5000 Version 12.8 (Vilber Lourmat) aufgenommen. Membranen mit Proteinen aus Zelllysaten wurden für 15 min bei RT mit *ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution* (Millipore) inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit Blocklösung für je 5 min mit anti-β-Aktin-Antikörper in Blocklösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion der β-Aktinbanden als Ladekontrolle erfolgte analog wie oben beschrieben. Für die semi-quantitative Auswertung der Bandenintensität wurde die Software ImageJ Version 1.48v verwendet.

Tab. 34 TBS-T

Komponente	Hersteller
20 mM Tris	Appllichem
140 mM NaCl	Carl Roth
0,1 % Tween 20	Sigma-Aldrich
pH 7,6	

Tab. 35 Blocklösung

Komponente	Hersteller
5 % Milchpulver	Carl Roth
TBS-T	

Tab. 36 Verwendete Antikörper für Western Blots

Antigen	Spender	Format	Enzym	Klonalität	Ver- dünnung	Hersteller (Katalognummer)
Sox9	Kaninchen	IgG	-	polyklonal	1:5.000	Merck (#AB5535)
β-Aktin	Kaninchen	IgG	-	polyklonal	1:5.000	Abcam (#ab8227)
Kollagen I	Kaninchen	IgG	-	polyklonal	1:5.000	Abcam (#ab34710)
Kollagen III	Kaninchen	IgG	-	polyklonal	1:1.000	Abcam (#ab7778, Lot GR212346-1)
Kollagen III	Maus	IgM	-	monoklonal	1:100	Santa Cruz (#sc-514601)
Kaninchen IgG	Esel	IgG F(ab') ₂ Fragment	HRP	polyklonal	1:10.000	Jackson Immuno Research (#711-036-152)
Maus IgM	Ziege	IgG	HRP	polyklonal	1:2.000	Thermo Fisher Scientific (#62-6820)

3.3.5 Coomassie- und Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinextrakte aus Knorpel-explantaten wurden die Proteinbanden im Gel durch Coomassie- bzw. Silberfärbung sichtbar gemacht, um mögliche Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen mono- und kokultivierten Knorpel-explantaten zu detektieren. Außerdem wurden alle Western Blot-Gele nach dem Blotten gefärbt, um die Blockeffizienz zu kontrollieren.

Coomassie-Brilliant-Blau R-250 ist ein Farbstoff, der sich an basische und aromatische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und somit unspezifisch alle Proteine anfärbt. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande. Die Gele wurden für 1 h mit Coomassie-Lösung (Tab. 37) gefärbt, anschließend 1 h in Entfärber I (Tab. 38) und über Nacht in Entfärber II (Tab. 39) inkubiert und fotografiert.

Tab. 37 Coomassie-Lösung

Komponente	Hersteller
2,5 g Coomassie-Brillant-Blau R-250	Carl Roth
250 ml Isopropanol	Carl Roth
200 ml Eisessig	Carl Roth
auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

Tab. 38 Entfärber I

Komponente	Hersteller
500 ml Methanol	Merck
100 ml Eisessig	Carl Roth
auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

Tab. 39 Entfärber II

Komponente	Hersteller
100 ml Methanol	Merck
100 ml Eisessig	Carl Roth
auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

Die Silberfärbung besitzt im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine höhere Sensitivität (ca. 1 ng Protein pro Bande). Zunächst wurden die Gele zweimal für 8 min in Entfärber I gewaschen, um das SDS aus dem Gel zu entfernen. Anschließend wurden die Proteine im Gel für 20 min durch Inkubation in Fixierlösung (Tab. 40) fixiert. Nach dreimaligem Waschen in Wasser für jeweils 5 min, wurden die Gele für 15 min in Silbernitratlösung (Tab. 41) inkubiert. Bei diesem Schritt lagern sich Silberionen an negativ geladene Seitenketten der Proteine an. Nach kurzem Waschen in Entwicklerlösung (Tab. 42) wurden die Gele in frischer Entwicklerlösung inkubiert, bis Banden sichtbar wurden, denn die Silberionen werden bei diesem Schritt durch das Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäure (7 %, Carl Roth) gestoppt und die Gele fotografiert. Die gefärbten Gele wurden nach dem Entwässern für 2 x 30 min in Entwässerungslösung (Tab. 43) in Cellophanfolie (Carl Roth) in Geltrocknungsrahmen eingespannt und für zwei Tage getrocknet.

Tab. 40 Fixierlösung

Komponente	Hersteller
100 mg Natriumthiosulfat-pentahydrat	Carl Roth
30 ml Ethanol	Sigma-Aldrich
10 ml Natriumacetat-Lösung (4 M)	Carl Roth
400 µl Eisessig	Carl Roth
1 ml Glutardialdehyd (25 %)	Merck
auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen	

Tab. 41 Silbernitratlösung

Komponente	Hersteller
100 mg Silbernitrat	Applichem
25 µl Formaldehyd (37 %)	Applichem
auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen	

Tab. 42 Entwicklerlösung

Komponente	Hersteller
2,5 g Natriumcarbonat	Applichem
40 µl Formaldehyd (37 %)	Applichem
auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen	

Tab. 43 Entwässerungslösung

Komponente	Hersteller
100 ml Glycerin	Carl Roth
250 ml Ethanol	Sigma-Aldrich
auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

3.3.6 Gelatine-Zymographie

Mittels Zymographie lassen sich Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Zellkulturüberständen und Zelllysaten nachweisen. MMPs werden als Zymogene, inaktive Vorläuferformen des Enzyms, synthetisiert, bei denen ein Zinkion im aktiven Zentrum das Binden an und die Spaltung des Substrats verhindert. Die Kalzium-abhängige Aktivierung erfolgt extrazellulär durch Abspaltung des Propeptids und das aktive Enzym katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen von ECM-Proteinen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Detektion von MMPs zunutze, indem man dem Acrylamidgel das Substrat (Gelatine oder Casein) des zu untersuchenden Enzyms zugibt und die Proteine im Zellkulturüberstand elektrophoretisch auftrennt. Anschließend wird das Gel in einem Kalzium-haltigen Puffer bei 37 °C inkubiert und das aktivierte Enzym verdaut sein Substrat. Mit Coomassie-Blau lässt sich das gesamte Gel wegen des enthaltenen Proteinsubstrats blau färben. Die Bereiche, in denen das Enzym das Substrat verdaut hat, bleiben allerdings ungefärbt und erscheinen somit als helle Banden auf dem blauen Gel auf Höhe des Molekulargewichts der einzelnen MMPs. Mittels Casein-Zymographie lässt sich z.B.

MMP-13 nachweisen und in Gelatine-Zymogrammen können MMP-2 und MMP-9 sichtbar gemacht werden.

Um die MMP-2-Sekretion von mono- und kokultivierten BMSC zu untersuchen, wurden Gelatine-Zymogramme hergestellt. Dazu wurden entsprechende Volumina des Zellkulturüberstands, die 20 µg Gesamtprotein enthielten, mit Zymogramm-Ladepuffer (Tab. 44) versetzt und auf 10 % Maxi-Gele mit 0,1 % Gelatine (Fluka) aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele zweimal 30 min lang in 2,5 % Triton X-100-Lösung (Sigma-Aldrich) gewaschen, um das SDS aus den Gelen zu entfernen, das die Enzymaktivität stören würde. Danach wurde 4 x 5 min mit Wasser gewaschen, um das Triton X-100 zu entfernen. Anschließend wurden die Gele für 24 h bei 37 °C in Entwicklerlösung (Tab. 45) inkubiert. In dieser Zeit verdauten die MMPs die Gelatine. Die Proteine wurden durch Inkubation für 30 min in Entfärber I (Tab. 38) fixiert, anschließend für 30 min mit Coomassie-Lösung (Tab. 37) gefärbt und 30 min in Entfärber I und über Nacht in Entfärber II (Tab. 39) inkubiert, fotografiert, entwässert und getrocknet (Abschn. 3.3.5, S. 58). Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mit ImageJ relativ zur Monokultur (100 %).

Tab. 44 Zymogramm-Ladepuffer

Komponente	Hersteller
5 mM EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth
5 % SDS	Carl Roth
50 mM Tris, pH 8.0	Applichem
50 % Glycerol	Sigma-Aldrich
0,05 % Bromphenolblau	Sigma-Aldrich

Tab. 45 Zymogramm-Entwicklerlösung

Komponente	Hersteller
50 mM Tris, pH 8.5	Applichem
5 mM Kalziumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich

3.3.7 *Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)*

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem durch eine enzymatische Farbreaktion der Gehalt eines bestimmten Faktors in einer Probe anhand einer Standardreihe quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurden ausschließlich sog. Sandwich-ELISAs verwendet. Bei dieser Technik kommen zwei Antikörper zum Einsatz, die an unterschiedliche Epitope des Antigens, also des nachzuweisenden Proteins, binden, sodass das Antigen wie in einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern liegt. Standards und Proben, Zelllysate oder Zellkulturüberstand, werden in spezielle 96-Well-Platten

pipettiert, die mit dem sog. *capture antibody* gecoatet sind, der das Zielprotein bindet. Nach mehreren Waschschritten wird ein biotinylierter sog. *detection antibody* zugegeben, der an das Zielprotein bindet. Überschüssiger, nicht-gebundener Antikörper wird gewaschen und *Horseradish peroxidase* (HRP)-konjugiertes Streptavidin zugegeben, welches über die Interaktion mit Biotin an den *detection antibody* bindet. Gibt man nun das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu, wird dieses von der Peroxidase umgesetzt und es entwickelt sich eine blaue Farbe, die durch Zugabe von Stopplösung in gelb umschlägt. Die Farbintensität wird bei 450 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Anhand der optischen Dichten (ODs) der Standardproteine mit bekannter Konzentration lässt sich über eine Standardkurve der Proteingehalt in den untersuchten Proben berechnen.

3.3.7.1 Interleukin 8 (IL-8)

Die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand von BMSC in Mono- und Kokultur mit OA- bzw. N-Knorpelexplantaten wurde mit dem *RayBio Human IL-8 ELISA Kit* (RayBiotech) bestimmt und anhand des Gewichts des jeweiligen Knorpelexplantats auf 100 mg Knorpel bezogen. Der Detektionsrahmen dieses ELISAs betrug 1 pg/ml - 600 pg/ml.

3.3.7.2 Connective tissue growth factor (CTGF)

Zur Bestimmung von CTGF im Zellkulturüberstand sowie im Zelllysats von BMSC und Chondrozyten in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten wurde das *OmniKine Human CTGF Colorimetric ELISA Kit* (Assay Biotechnology) verwendet. Der Detektionsrahmen dieses ELISAs betrug 63 pg/ml - 4.000 pg/ml. Die Normalisierung erfolgte anhand der Gesamtproteinkonzentration des Überstands bezogen auf 1 mg Gesamtprotein. Die CTGF-Konzentration des Zelllysats bezieht sich auf 1 Fibringel, d.h. auf 1×10^6 BMSC bzw. auf 2×10^6 Chondrozyten. Die jeweilige Monokultur bzw. Tag 7 wurden gleich 100 % gesetzt.

3.3.7.3 Interferon gamma (IFN- γ)

Um zu überprüfen, ob OA-Knorpelexplantate IFN- γ sezerniert, wurde zunächst das *RayBio Human IFN-gamma ELISA Kit* (RayBiotech) mit einem Detektionsrahmen von 15 pg/ml - 15.000 pg/ml verwendet. Anschließend wurde der sensitivere *Human IFN- γ High Sensitivity ELISA* (Affymetrix) durchgeführt, dessen Detektionsrahmen 0,16 pg/ml - 10 pg/ml betrug.

3.3.8 Multiplex-Immunoassay

Um zu untersuchen, ob Kokultur mit Knorpelimplantaten die Proteinsekretion von BMSC beeinflusst und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen OA- und N-Knorpelimplantaten gibt, wurden Zellkulturüberstände von BMSC in Mono- und Kokultur mit OA- und N-Knorpelimplantaten sowie von zellfreien OA- und N-Knorpelimplantaten nach 28 Tagen in Kultur auf eine Vielzahl von Analyten (Tab. 46) wie z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren mittels eines Multiplex-Immunoassays (Luminex[®]) von der HOT Screen GmbH in Reutlingen analysiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit einer Messung eine Vielzahl von Analyten gleichzeitig in einer Probe gemessen werden kann. Wie beim ELISA kommen *capture antibodies* zum Einsatz, die gegen die verschiedenen Analyte gerichtet und an farbcodierte Beads gekoppelt sind. Nach Zugabe des biotinylierten *detection antibody*, der an das Zielprotein bindet, und Phycoerythrin (PE)-konjugiertem Streptavidin, das an Biotin bindet, werden die Proben in einem speziellen Detektionsgerät mit zwei Lasern gemessen: ein Laser klassifiziert die Beads und bestimmt somit die Analyte; der zweite Laser misst die Stärke des PE-Signals, die direkt proportional zur gebundenen Menge des Analyten in der Probe ist.

3.3.9 BrdU-Assay zur Messung der Zellproliferation

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde ein kolorimetrischer Immunassay verwendet (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche), bei dem 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) dem Zellkulturmedium zugegeben wurde, welches dann anstelle von Thymidin in neusynthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Anschließend wurden die Zellen fixiert, die DNA denaturiert und ein gegen BrdU-gerichteter, Peroxidase-gekoppelter Antikörper (anti-BrdU-POD) zugegeben, der an inkorporiertes BrdU in der DNA bindet. Nach Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB), welches von der Peroxidase umgesetzt wird, kommt es zu einer blauen Farbentwicklung, die durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt wird und einen Farbumschlag von blau nach gelb bewirkt. Die Farbintensität wurde anschließend bei 450 nm in einem Spektrophotometer (Tecan GENios) gemessen und da die optischen Dichten (ODs) direkt mit der Menge an neusynthetisierter DNA und somit mit der Anzahl proliferierender Zellen korrelieren, lassen sich Proliferationsraten unterschiedlich behandelter Zellkulturen relativ zueinander vergleichen.

Tab. 46 Lister der gemessenen Analyte

Analytname	Abkürzung	Untere Bestimmungsgrenze
Alpha-Fetoprotein	AFP	0,0551 ng/ml
Brain-Derived Neurotrophic Factor	BDNF	0,0116 ng/ml
Cancer Antigen 125	CA-125	1,00 U/ml
Carcinoembryonic Antigen	CEA	0,0479 ng/ml
Creatine Kinase-MB	CK-MB	0,0787 ng/ml
Endothelin-1	ET-1	23,6 pg/ml
Eotaxin-1		6,15 pg/ml
Epidermal Growth Factor	EGF	1,06 pg/ml
Epithelial-Derived Neutrophil-Activating Protein 78	ENA-78	0,00958 ng/ml
Erythropoietin	EPO	2,43 pg/ml
Factor VII		0,281 ng/ml
Fatty Acid-Binding Protein, heart	FABP	0,309 ng/ml
Fibroblast Growth Factor basic	FGF	46,9 pg/ml
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	GM-CSF	9,54 pg/ml
Growth Hormone	GH	0,0181 ng/ml
Immunoglobulin E	IgE	1,02 ng/ml
Insulin		0,173 uIU
Intercellular Adhesion Molecule 1	ICAM-1	0,322 ng/ml
Interleukin-1 alpha	IL-1 α	0,000500 ng/ml
Interleukin-1 beta	IL-1 β	0,179 pg/ml
Interleukin-2	IL-2	3,00 pg/ml
Interleukin-3	IL-3	0,00204 ng/ml
Interleukin-4	IL-4	2,61 pg/ml
Interleukin-5	IL-5	1,15 pg/ml
Interleukin-6	IL-6	0,431 pg/ml
Interleukin-7	IL-7	4,22 pg/ml
Interleukin-8	IL-8	1,37 pg/ml
Interleukin-10	IL-10	1,14 pg/ml
Interleukin-12 Subunit p40	IL-12p40	0,0369 ng/ml
Interleukin-12 Subunit p70	IL-12p70	9,03 pg/ml
Interleukin-13	IL-13	1,02 pg/ml
Interleukin-15	IL-15	0,0935 ng/ml
Interleukin-16	IL-16	6,13 pg/ml
Interleukin-18	IL-18	6,19 pg/ml
Interleukin-25	IL-25	9,37 pg/ml
Leptin		0,0302 ng/ml
Lymphotactin		0,0427 ng/ml
Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha	MIP-1 α	4,67 pg/ml
Macrophage Inflammatory Protein-1 beta	MIP-1 β	6,82 pg/ml
Macrophage-Derived Chemokine	MDC	2,91 pg/ml
Matrix Metalloproteinase-3	MMP-3	0,0212 ng/ml
Matrix Metalloproteinase-9	MMP-9	3,92 ng/ml
Monocyte Chemotactic Protein 1	MCP-1	4,33 pg/ml
Prostate-Specific Antigen, Free	PSA	0,00216 ng/ml
Stem Cell Factor	SCF	13,1 pg/ml
Thrombopoietin	TPO	0,210 ng/ml
Thyroid-Stimulating Hormone	TSH	0,00977 uIU/ml
Tissue Factor	TF	0,0448 ng/ml
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF- α	1,79 pg/ml
Tumor Necrosis Factor beta	TNF- β	1,31 pg/ml
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF	12,1 pg/ml

4.000 BMSC wurden in Triplikaten in 96-Well-Platten (Corning) in Proliferationsmedium (Tab. 2, S. 33) für Stimulations- und Transfektionsexperimente ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurde das Medium durch konditioniertes Medium (KM) bzw. nicht-konditioniertes Medium (NM) ersetzt, welches nach zwei Tagen erneuert wurde. Die Transfektion mit miR-29b-Mimic oder *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) wurde, wie unter Abschn. 3.1.7 (S. 40) beschrieben, ebenfalls 24 h nach der Aussaat begonnen und das Transfektionsmedium nach 24 h durch chondrogenes Medium ersetzt, welches nach zwei Tagen erneuert wurde. 72 h nach Beginn der Stimulation mit KM bzw. Transfektion mit miR-29b-Mimic, wurde die *BrdU labeling solution* zugegeben und die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der BrdU-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Proliferationsrate der in KM kultivierten bzw. mit miR-29b-Mimic transfizierten BMSC relativ zu der in NM kultivierten bzw. mit NT-miR-transfizierten BMSC (100 %) quantifiziert.

3.3.10 Caspase-3/7-Assay zur Messung der Apoptoserate

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde ein Enzymaktivitätsassay verwendet, mit dem die Aktivität der Caspase-3 und Caspase-7 gemessen werden kann (*Apo-ONE Homogenous Caspase 3/7 Assay*, Promega). Diese beiden Mitglieder aus der Familie der cysteine aspartic acid-specific protease (Caspase) spielen eine Rolle in der Enzymkaskade zur Einleitung der Apoptose. Caspase-3 und -7 erkennen die DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) Peptidsequenz und spalten diese am C-terminalen Ende des Aspartatrests. Diese spezifische Enzymaktivität macht man sich beim Apoptoseassay zunutze, indem man zu den Zellen, deren Caspaseaktivität bestimmt werden soll, ein nicht-fluoreszierendes Substrat (rhodamine 110, bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide), kurz (Z-DEVD)₂-R110) zugibt, von dem durch aktive Caspasen die DEVD-Peptide abgespalten werden, wodurch das Rhodamin 110 nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 499 nm grün fluoresziert mit einem Emissionsmaximum bei 521 nm. Die Fluoreszenz kann dann mit einem Spektrophotometer (Tecan GENios) gemessen werden und dient als Maß der Konzentration an aktiven Caspasen, wodurch sich die Apoptoseaktivität unterschiedlich behandelter Zellkulturen relativ zueinander vergleichen lässt.

4.000 BMSC wurden in Triplikaten in schwarze 96-Well-Platten mit klarem Boden (Corning) in Proliferationsmedium (Tab. 2, S. 33) für Stimulations- und Transfektionsexperimente ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurde das Medium durch konditioniertes Medium (KM) bzw. nicht-konditioniertes Medium (NM) ersetzt, welches nach zwei Tagen erneuert wurde. Die Transfektion mit miR-29b-Mimic, Inhibitor oder *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) wurde, wie unter Abschn. 3.1.7 (S. 40) beschrieben, ebenfalls 24 h nach der Aussaat begonnen und das Transfektionsmedium nach 24 h durch chondrogenes Medium bzw. KM ersetzt, welches nach zwei Tagen erneuert wurde. 96 h nach Beginn der Stimulation mit KM bzw. nach der Transfektion mit miR-29b-Mimic wurde das *Apo-One Caspase-3/7 Reagent* zugegeben und die Fluoreszenz nach 3 h Inkubation gemessen. Mit miR-29b-Inhibitor transfizierte BMSC wurden 72 h nach der Transfektion und 48 h Kultur in KM analysiert. Die Fluoreszenz wurde 8 h nach Substratzugabe gemessen.

3.4 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism (Version 6) der Firma GraphPad Software verwendet. Die Ergebnisse sind als Boxplots dargestellt mit Median, oberer und untere Quartile und Whiskern, die den größten und kleinsten Wert markieren oder als Mittelwert mit Standardabweichung (SD). Ob Unterschiede relativ zur jeweils angegebenen Kontrolle (0 bzw. 100 %) signifikant sind, wurde mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon Signed-Rank Test für gepaarte Stichproben berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen absoluten Werten wurden mit dem nicht-parametrischen Mann Whitney Test für ungepaarte Stichproben ermittelt. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet. Signifikante Ausreißer ($\alpha=0,05$) wurden mit dem Grubbs-Test bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung humaner BMSC

4.1.1 *Population doubling level* und Proliferationsrate

BMSC wurden bis Passage 3 in Proliferationsmedium expandiert und anschließend für Versuche verwendet. Wegen der schwer abschätzbaren Anzahl an BMSC in der ersten Kultur nach der Isolierung, wurden kumulative *population doubling level* (CPDL) erst nach der P0-Zellernte errechnet. Ein Anstieg des CPDL wurde von P1 bis P3 beobachtet (Abb. 15A), der durchschnittliche CPDL von BMSC nach 3 Passagen lag bei $5,66 \pm 1,27$ und die mittlere Zeit in Expansionskultur betrug $20,31 \pm 2,18$ Tage. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Proliferationsrate von $0,28 \pm 0,07$ *population doublings* pro Tag, wobei die Verdopplungsrate von einer Passage zur nächsten abnahm (Abb. 15B).

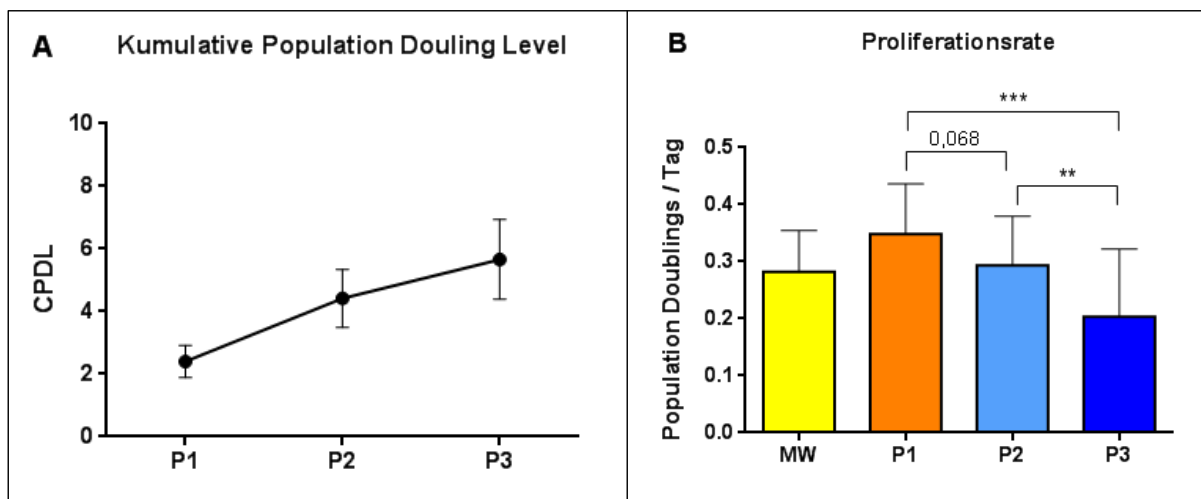


Abb. 15 Kumulative *population doubling level* und Proliferationsraten von BMSC

Der CPDL von BMSC stieg von P1 bis P3 an (A), wobei die Proliferationsrate mit jeder Passage abnahm (B). Mittelwert (MW) \pm SD (n=16); **=p<0,01, ***=p<0,001; signifikante Unterschiede zwischen den angegebenen Passagen; nicht-parametrischer Mann Whitney Test.

4.1.2 Expression von Oberflächenmarkern auf BMSC

Um die Reinheit der isolierten MSC-Populationen aus Patientenknochenmarkproben zu analysieren und mögliche Kontaminationen z.B. mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aufzudecken, wurde die Expression bestimmter Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie untersucht. Da es keinen einzelnen, spezifischen Marker für mesenchymale Stammzellen gibt, wurde neben der Plastikadhärenz und des adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotentials zur Charakterisierung von MSC die Expression eines Sets an Oberflächenmarker als Kriterium herangezogen. Möglichst reine BMSC-Populationen zeichnen sich durch mehr als 95 % CD73-, CD90- und CD105-positive Zellen und weniger als 2 % CD19- und CD34-positive Zellen wie HSC aus. Alle stichprobenartig überprüften BMSC-Populationen bestanden hauptsächlich aus CD73-, CD90- und CD105-exprimierenden Zellen und enthielten nur wenige CD19- und CD34-positive Zellen (Tab. 47, Abb. 16).

Tab. 47 Expression von Oberflächenmarkern auf BMSC

Übersicht über den prozentualen Anteil an Zellen in der Gesamtpopulation, die einen bestimmten Oberflächenmarker exprimierten.

BMSC Patienten-Nr.	CD19⁺ (≤ 2 %)	CD34⁺ (≤ 2 %)	CD73⁺ (≥ 95 %)	CD90⁺ (≥ 95 %)	CD105⁺ (≥ 95 %)
539	0,62 %	0,62 %	90,5 %	95,0 %	84,8 %
565	0,3 %	3,0 %	98,4 %	98,9 %	96,8 %
669	0,24 %	0,48 %	96,8 %	96,6 %	94,3 %
684	0,67 %	0,67 %	96,8 %	94,1 %	93,3 %
704	0,85 %	1,04 %	99,3 %	99,5 %	99,2 %
720	0,14 %	0,13 %	96,2 %	95,9 %	95,3 %

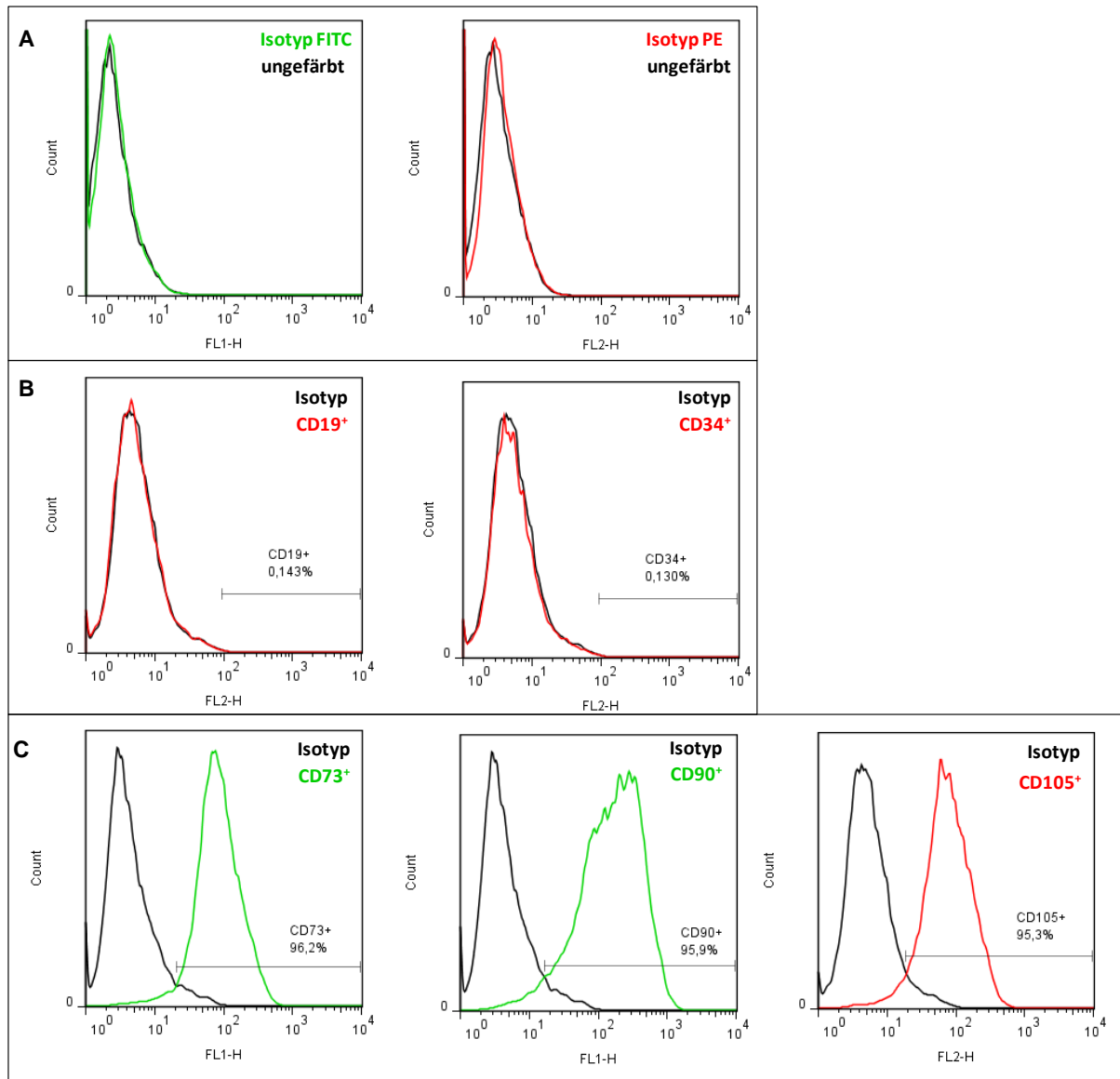


Abb. 16 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf BMSC

(A) Unspezifisches Binden der Isotyp-Kontrollen (FITC: grün, PE: rot) wurde durch den Vergleich mit ungefärbten BMSC (schwarze Linie) ausgeschlossen. (B) BMSC-Populationen in Passage 3 enthielten nur wenige CD19- und CD34-positive Zellen und (C) überwiegend CD73-, CD90- und CD105-positive BMSC. Schwarze Linie: Isotyp-Kontrolle, rote bzw. grüne Linie: entsprechender Oberflächenmarker.

4.2 Einfluss von BMSC und Chondrozyten auf die Proteinexpression der kokultivierten Knorpelimplantate

Um den Einfluss von BMSC, Chondrozyten und eines Gemisches aus beiden Zelltypen auf das kokultivierte Knorpelimplantat zu untersuchen, wurden nach Entfernen der Fibringele sequentielle Proteinextrakte mit Natriumchlorid (NaCl) und Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) aus dem Knorpelgewebe hergestellt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend das Bandenmuster der mit Silberfärbung bzw. mit Coomassie-Blau angefärbten Proteine im Gel verglichen. Die Vorfraktionierung der GdnHCl-löslichen Proteine in größer bzw. kleiner 100 kDa mittels Amicon Zentrifugen-Filtereinheiten führte dazu, dass die Proteinkonzentration des Filtrats mit den kleinen Proteinen zu gering für die SDS-PAGE war, sodass darauf verzichtet werden musste.

Zwischen den Proteinextrakten aus OA-Knorpelimplantaten, die mit einem zellfreien Fibringel (+F) oder Fibringelen mit BMSC (+MSC), Chondrozyten (+Ch) bzw. einem Gemisch beider Zelltypen (+Mix) für 7 bzw. 28 Tage kokultiviert wurden, konnten im Bandenmuster weder Unterschiede zwischen den verschiedenen Kokulturbedingungen noch zwischen den zwei Zeitpunkten detektiert werden (Abb. 17).

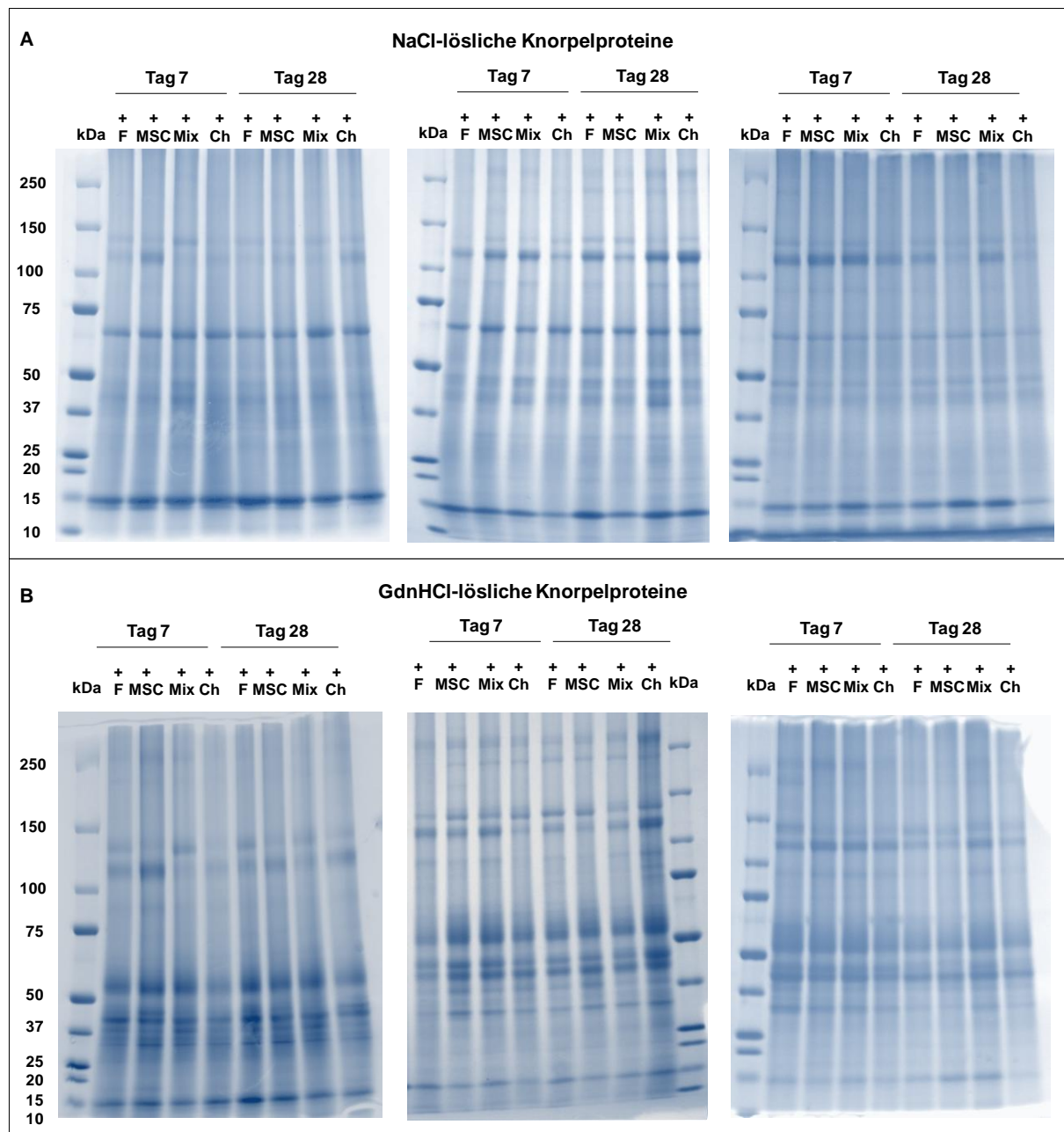


Abb. 17 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA-Knorpel-explantat-Proteinextrakte)

Zwischen den Proteinextrakten aus OA-Knorpel-explantaten, die mit einem zellfreien Fibringel (+F) bzw. mit Fibringelen mit BMSC (+MSC), Chondrozyten (+Ch) oder einem Gemisch beider Zelltypen (+Mix) für 7 bzw. 28 Tage kokultiviert wurden, waren keine Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zu erkennen. Beispiele dreier Knorpelproben von unterschiedlichen OA-Patienten, (A) NaCl-lösliche Proteinfraktion, (B) GdnHCl-lösliche Proteinfraktion, kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards.

Auch mittels der sensitiveren Silberfärbung konnten keine Unterschiede im Bandenmuster detektiert werden (Abb. 18).

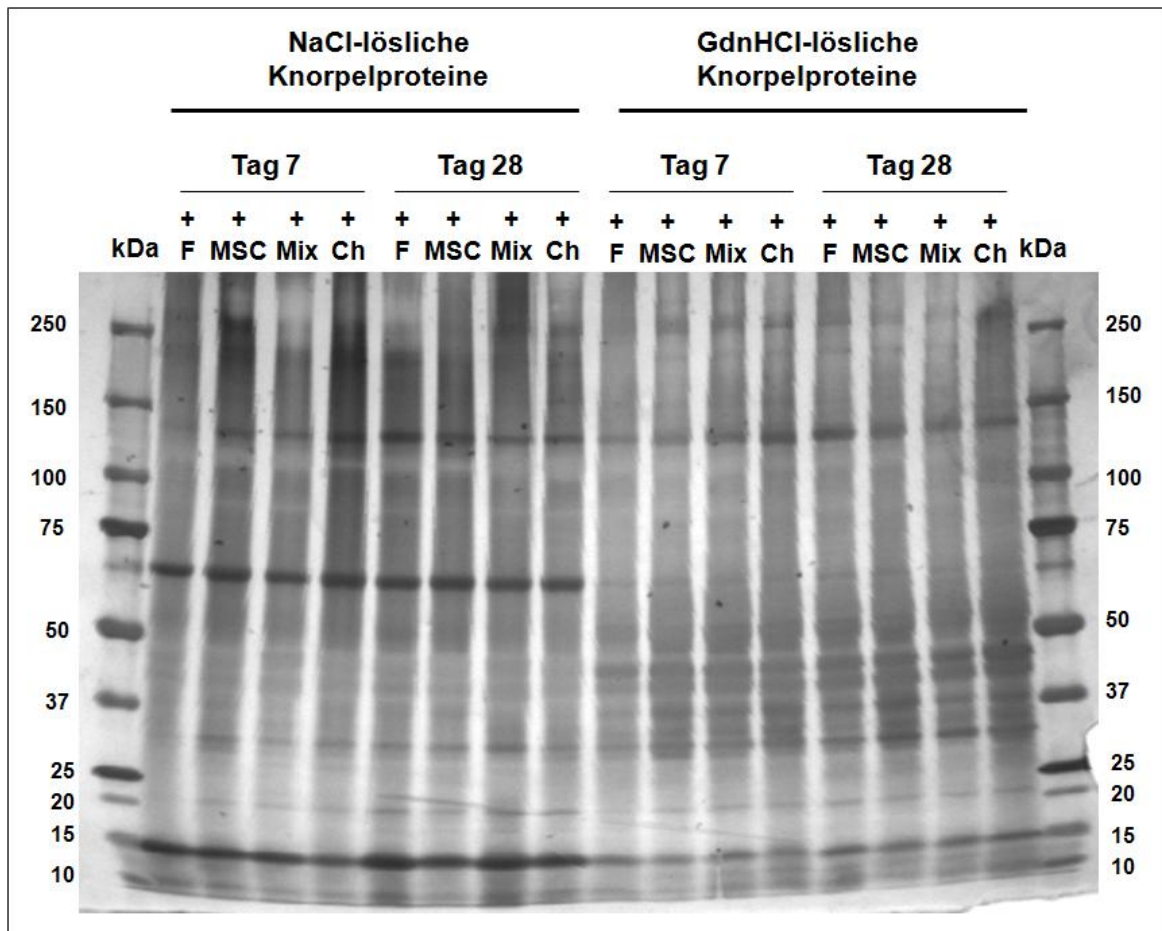


Abb. 18 Silberfärbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA-Knorpel-explantat-Proteinextrakte)

Zwischen den Proteinextrakten aus OA-Knorpel-explantaten, die mit einem zellfreien Fibringel (+F) bzw. mit Fibringelen mit BMSC (+MSC), Chondrozyten (+Ch) oder einem Gemisch beider Zelltypen (+Mix) für 7 bzw. 28 Tage kokultiviert wurden, waren keine Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zu erkennen. kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinextrakte aus OA- bzw. N-Knorpel-explantaten, die mit BMSC in Fibringel bzw. einem zellfreien Fibringel für 7 und 28 Tage kokultiviert wurden, wiesen ebenfalls keine eindeutigen Unterschiede im Bandenmuster zwischen OA- und N-Knorpel bzw. mono- und kokultiviertem Knorpel-explantat oder Tag 7 und Tag 28 auf (Abb. 19).

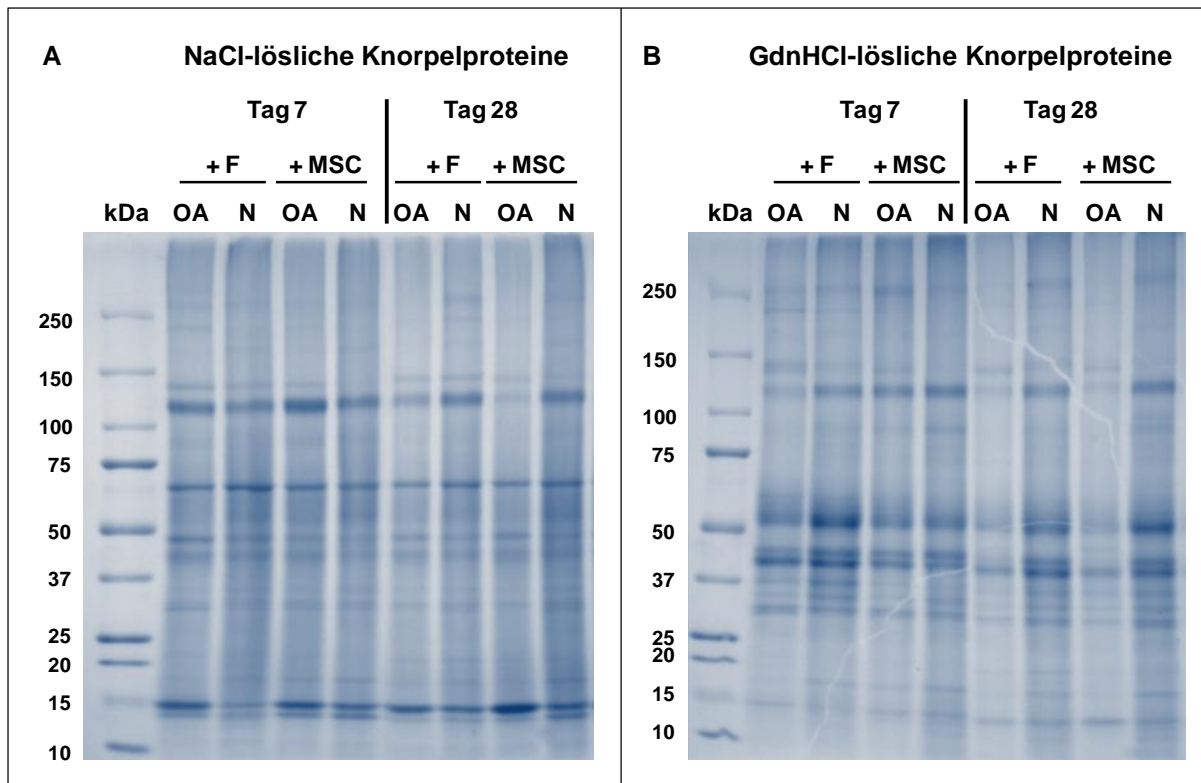


Abb. 19 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA- und N-Knorpelexplantat-Proteinextrakte)

Zwischen den Proteinextrakten aus OA-Knorpelexplantaten (OA) und N-Knorpelexplantaten (N), die mit einem zellfreien Fibrinogen (+F) bzw. mit Fibrinogenen mit BMSC (+MSC) für 7 bzw. 28 Tage kokultiviert wurden, waren keine Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zu erkennen. (A) NaCl-lösliche Proteinfraction, (B) GdnHCl-lösliche Proteinfraction, kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards.

Um eine feinere Auftrennung der Knorpelproteinextrakte, die hauptsächlich aus großen Matrixproteinen bestehen und nur wenige zytoplasmatische Chondrozytenproteine enthalten, zu erreichen, wurden eigene Versuche mittels 2D-Elektrophorese durchgeführt sowie Proben zur Analyse an ein Proteinlabor der TU München (Fakultät für Chemie, Fachgebiet Industrielle Biokatalyse, AG Prof. Brück) versandt. Allerdings ließ sich das aus Knorpelgewebe extrahierte Proteingemisch auch trotz vorheriger enzymatischer Deglykosylierung nur unzureichend anhand des isoelektrischen Punktes auftrennen. Deshalb waren bei der anschließenden elektrophoretischen Trennung nach dem Molekulargewicht keine einzelnen Spots, sondern nur eine große Wolke zu erkennen.

4.3 Gegenseitige Beeinflussung der Proteinsekretion von Knorpel-explantaten und BMSC bei Kokultur

Um zu untersuchen, ob Kokultur mit Knorpel-explantaten die Proteinsekretion von BMSC beeinflusste und ob es Unterschiede zwischen OA- und N-Knorpel-explantaten gab, wurden Zellkulturüberstände von BMSC in Mono- und Kokultur mit OA- und N-Knorpel-explantaten sowie von zellfreien OA- und N-Knorpel-explantaten nach 28 Tagen in Kultur auf eine Vielzahl von Analyten wie z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren mittels eines Luminex-Multiplex-Immunoassays von der HOT Screen GmbH in Reutlingen analysiert.

Interleukin-6 (IL-6), ein Regulator von Entzündungsreaktionen, konnte in allen untersuchten Zellkulturüberständen in ungefähr gleicher Menge detektiert werden (Abb. 20A). IL-1 β , ein pro-inflammatorisches Zytokin, wurde nicht von N-Knorpel-explantaten produziert (Abb. 20B). Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) spielt ebenfalls bei Entzündungen eine Rolle und konnte im Überstand von BMSC und Knorpel-explantaten jeweils in Mono- und gegenseitiger Kokultur detektiert werden (Abb. 20C). Die Matrixmetalloprotease 9 (MMP-9), welche denaturierte Kollagen-fibrillen abbaut, wurde von BMSC sowie OA- und N-Knorpel-explantaten in den Überstand abgegeben (Abb. 20D). Interleukin-8 (IL-8), ein chemotaktisches, inflammatorisches Zytokin, wurde sowohl von OA- als auch von N-Knorpel-explantaten sezerniert und konnte im Überstand von BMSC in Kokultur mit Knorpel-explantaten detektiert werden, wobei die von BMSC in Monokultur produzierte IL-8-Menge an der Detektionsgrenze des verwendeten Multiplex-ELISAs lag (Abb. 20E).

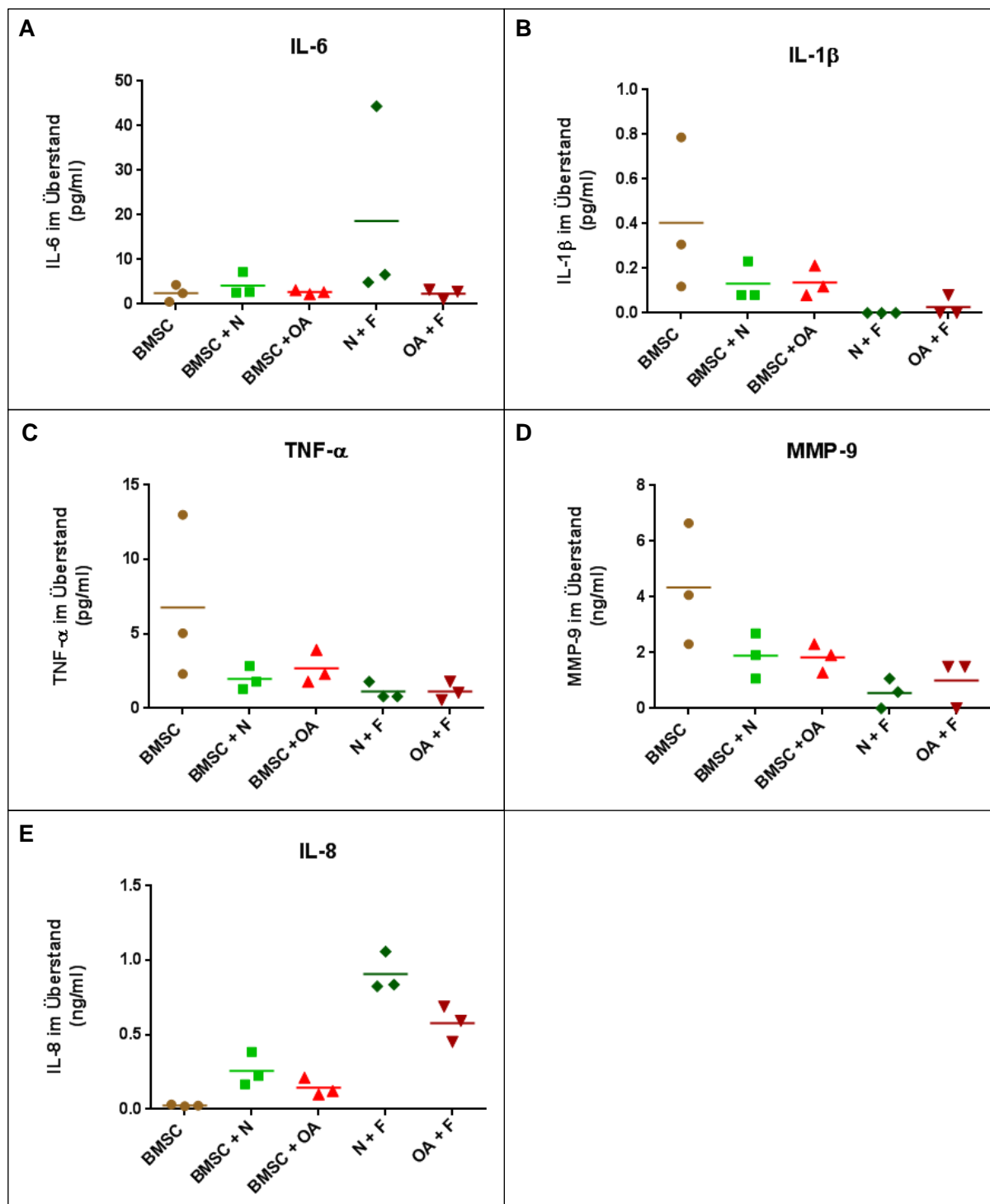


Abb. 20 Nachweis von BMSC, OA- und N-Knorpelexplantaten sezernierter Faktoren im Zellkulturüberstand

IL-6 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C), MMP-9 (D) und IL-8 (E) im Zellkulturüberstand von BMSC in Monokultur (BMSC, braune Punkte), in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (BMSC+N, hellgrüne Quadrate) oder OA-Knorpelexplantaten (BMSC+OA, hellrote Pyramiden) und von N-Knorpelexplantaten (N+F, dunkelgrüne Rauten) bzw. OA-Knorpelexplantaten mit zellfreiem Fibringel (OA+F, dunkelrote Dreiecke) an Tag 28; dargestellt sind die einzelnen Messwerte (n=3), die Linie zeigt den Mittelwert an.

Da sich für IL-8 Unterschiede zwischen Knorpel-explantaten in Mono- bzw. Kokultur mit BMSC andeuteten, wurden weitere Überstände mittels eines IL-8-ELISAs analysiert. Zwischen den Überständen von BMSC bzw. N- und OA-Knorpel-explantaten jeweils in Monokultur und Kokultur von Zellen und Explantat konnten an Tag 7 keine Unterschiede in der sezernierten Menge an IL-8 detektiert werden (Abb. 21A). An Tag 28 (Abb. 21B) enthielt der Überstand von BMSC sowohl in Kokultur mit OA- als auch mit N-Knorpel-explantaten mehr IL-8 als BMSC in Monokultur. Der Unterschied zwischen Knorpel-explantaten mit zellfreiem Fibringel und Kokultur mit BMSC in Fibringel war nur für OA-Knorpel-explantate signifikant. Sowohl N- als auch OA-Knorpel-explantate in Monokultur sezernierten signifikant mehr IL-8 als BMSC in Monokultur und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen N- und OA-Knorpel-explantaten, unabhängig davon, ob in Mono- oder Kokultur mit BMSC. In allen Kulturbedingungen nahm die IL-8-Sekretion von Tag 7 zu Tag 28 signifikant ab (Abb. 21C).

Da sich in der Luminex-Analyse abzeichnete, dass BMSC in Kokultur mit OA- oder N-Knorpel-explantaten weniger MMP-9 sezernierten als BMSC in Monokultur, wurden mit weiteren Überständen von BMSC, OA- und N-Knorpel-explantaten in Mono- und Kokultur Zymogramme erstellt. Mittels Gelatine-Zymographie lassen sich MMP-2 und MMP-9 nachweisen. Die Luminex-Analyse des Überstands ließ auf Unterschiede in der MMP-9-Proteinsekretion schließen, im Zymogramm konnten jedoch nur die Banden der Pro- und aktiven Form von MMP-2 detektiert werden. An Tag 7 sezernierten OA- und N-Knorpel-explantate in Monokultur weniger und in Kokultur mit BMSC mehr pro-MMP-2 im Vergleich zu BMSC in Monokultur (Abb. 22A). Bei der aktiven Form gab es keine signifikanten Unterschiede zu BMSC in Monokultur (Abb. 22B). Der Überstand von Knorpel-explantaten in Kokultur mit BMSC enthielt sowohl mehr pro-MMP-2 als auch mehr von der aktiven Form des Enzyms als die Knorpel-explantate mit zellfreiem Fibringel. An Tag 28 enthielt nur der Überstand von OA-Knorpel-explantaten mit zellfreiem Fibringel signifikant weniger pro- (Abb. 22D) und aktives MMP-2 (Abb. 22E) als der Überstand von BMSC in Monokultur und als der in Kokultur mit BMSC.

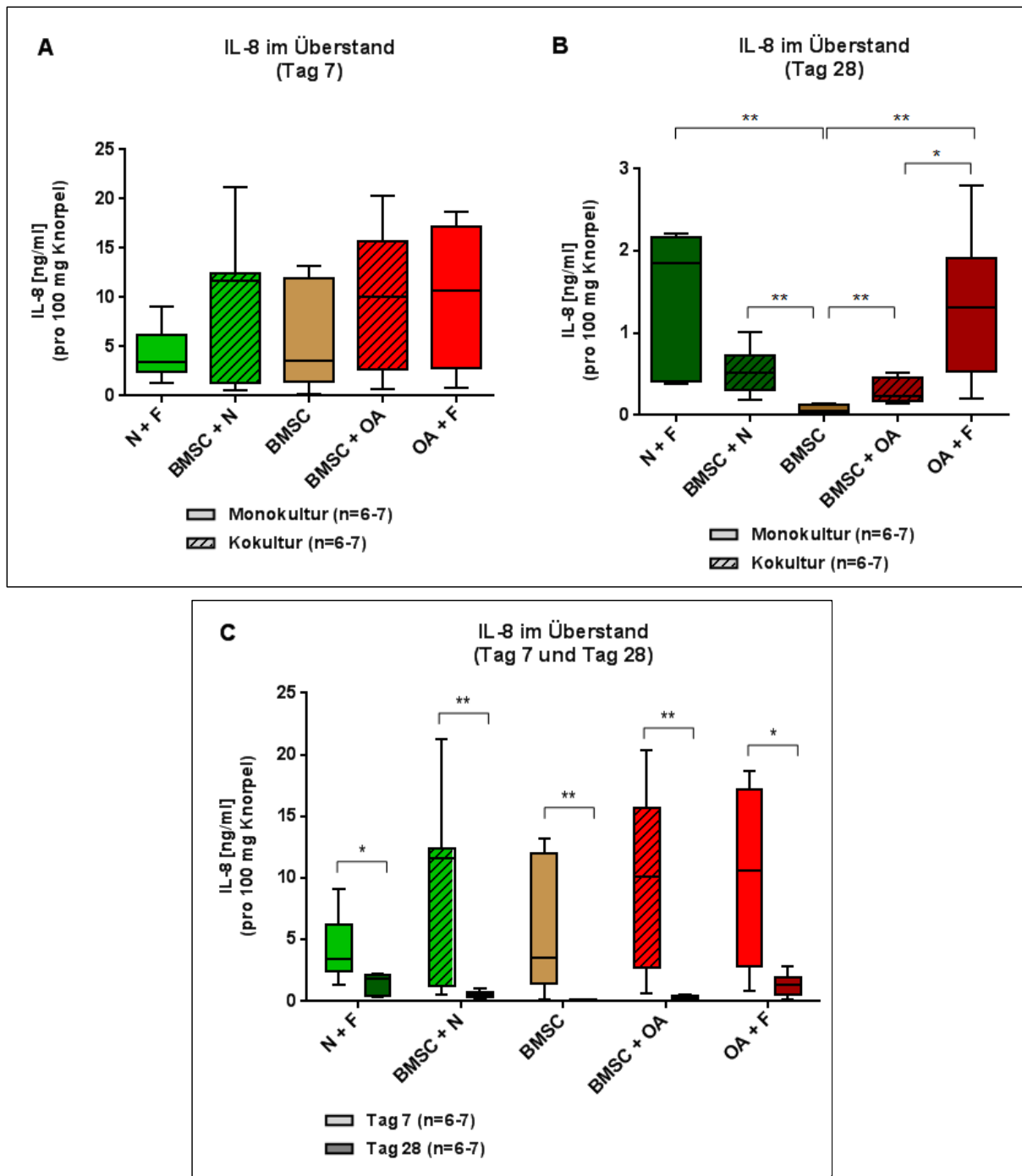


Abb. 21 IL-8 im Zellkulturüberstand von BMSC, N- und OA-Knorpelexplantaten in Mono- und Kokultur

IL-8 im Zellkulturüberstand von BMSC in Monokultur (braune Balken), in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (grüne, schraffierte Balken) oder OA-Knorpelexplantaten (rote, schraffierte Balken) und von N-Knorpelexplantaten (grüne Balken) bzw. OA-Knorpelexplantaten mit zellfreiem Fibringel (rote Balken) an (A) Tag 7, (B) Tag 28 und (C) an Tag 7 (helle Balken) und Tag 28 (dunkle Balken); *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$; signifikante Unterschiede zwischen den angezeigten Balken; nicht-parametrischer Mann Whitney Test.

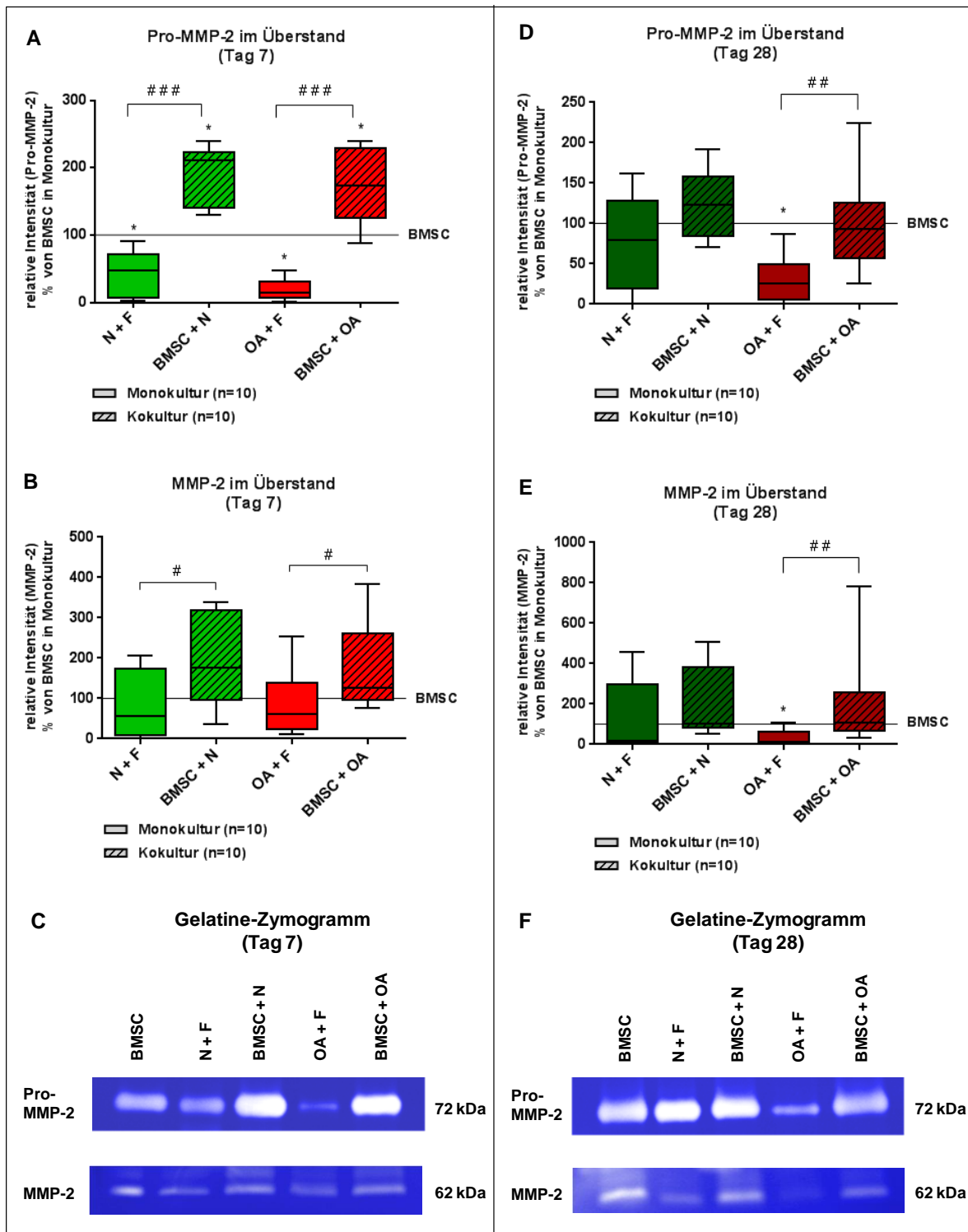


Abb. 22 MMP-2 im Zellkulturüberstand von BMSC, N- und OA-Knorpelexplantaten in Mono- und Kokultur

Pro-MMP-2 an Tag 7 (**A**) und Tag 28 (**D**) bzw. die aktive Form von MMP-2 an Tag 7 (**B**) und Tag 28 (**E**) im Zellkulturüberstand von N-Knorpelexplantaten (grüne Balken) und OA-Knorpelexplantaten (rote Balken) mit zellfreiem Fibrinogen (ohne Muster) oder mit BMSC in Fibrinogen (schraffierte Balken) im Vergleich zu BMSC in Monokultur (Linie bei 100 %); Repräsentative Ausschnitte der MMP-2-Banden im Zymogramm (**C**, **F**); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zu BMSC in Monokultur (Linie bei 100 %); nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test; #= $p < 0,05$; ##= $p < 0,01$; ###= $p < 0,001$; signifikanter Unterschied zwischen den angezeigten Balken (Mono- und Kokultur); nicht-parametrischer Mann Whitney Test.

4.4 Einfluss von Knochen- / Knorpelimplantaten auf die Expression von miRs und potentiellen Zielgenen in kokultivierten BMSC und Chondrozyten

4.4.1 miR-675-, miR-301- und COL2A1-Genexpression

Die Expression von Kollagen II kann u.a. direkt von der miR-301 reguliert werden (Shi *et al.*, 2011) oder indirekt durch miR-675, die die Expression oder Aktivität eines Repressors der Kollagen II-Expression modulieren soll (Dudek *et al.*, 2010).

4.4.1.1 Kokultur mit OA-Knochenimplantaten

OA-Knochenimplantate hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der miR-675 und die Genexpression von COL2A1 in kokultivierten BMSC (Abb. 23A) und nur BMSC in Monokultur wiesen eine signifikant erhöhte COL2A1-Expression an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 auf (Abb. 23B).

In Chondrozyten, die auf OA-Knochenimplantaten kokultiviert wurden, war die miR-675-Expression an Tag 7 erhöht und die COL2A1-Expression an Tag 28 reduziert im Vergleich zu Chondrozyten in Monokultur (Abb. 23C), wohingegen weder bei der Kokultur noch bei der Monokultur signifikante Unterschiede in der miR-675- und COL2A1-Expression zwischen Tag 7 und Tag 28 auftraten (Abb. 23D).

Wurde ein Gemisch aus BMSC und Chondrozyten auf OA-Knochenimplantaten kokultiviert, war die COL2A1-Expression an Tag 28 signifikant niedriger als im Gemisch, das ohne Implantat kultiviert wurde (Abb. 23E) und im Vergleich zu Tag 7 war nur der COL2A1-Expressionslevel des Gemisches in Monokultur an Tag 28 signifikant erhöht (Abb. 23F).

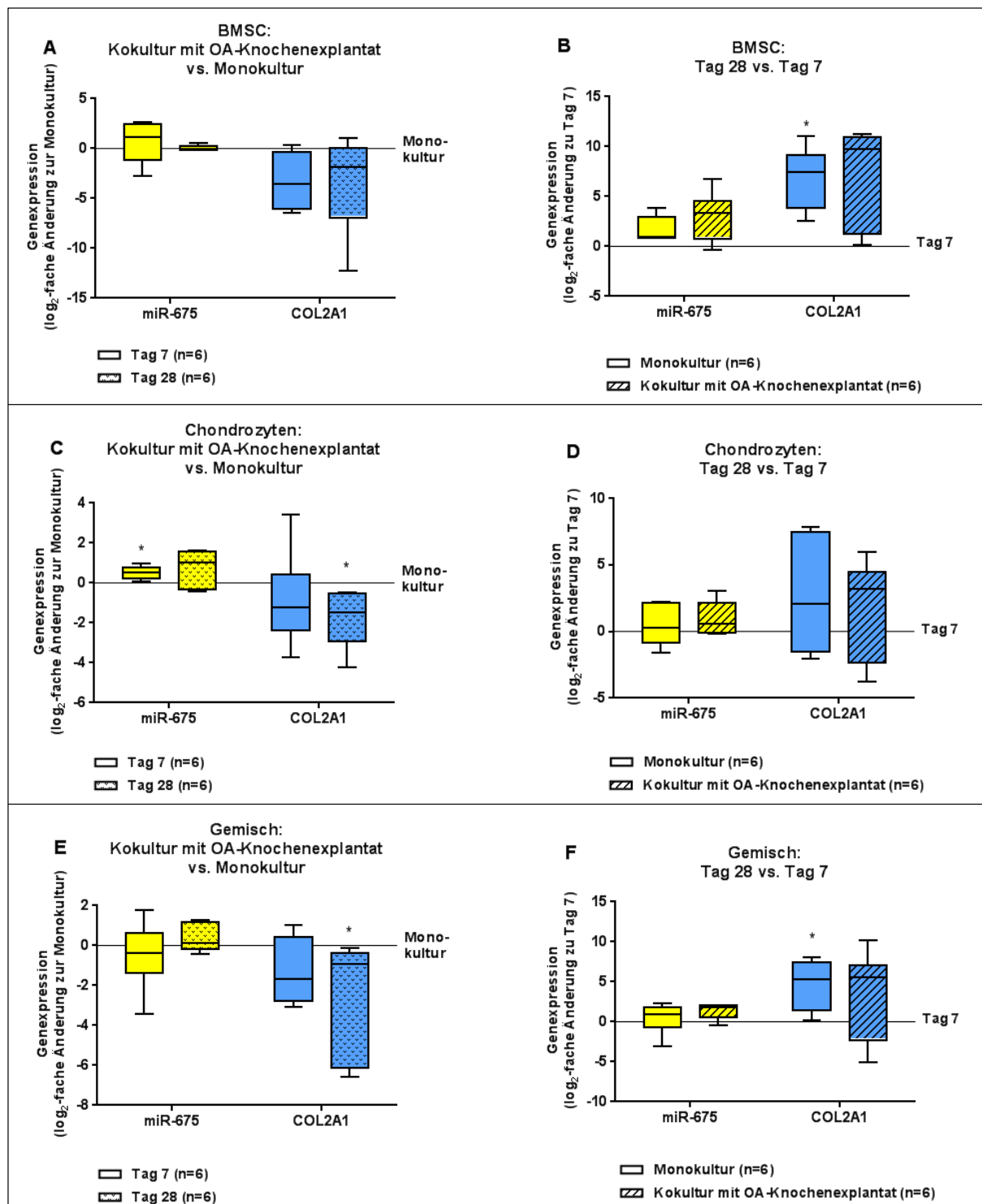


Abb. 23 Einfluss von OA-Knochenexplantaten auf die miR-675- und COL2A1-Genexpression
 miR-675- (gelbe Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC (A), Chondrozyten (C) und einem Gemisch beider Zelltypen (E) in Kokultur mit OA-Knochenexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-675- (gelbe Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC (B), Chondrozyten (D) und einem Gemisch beider Zelltypen (F) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knochenexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.4.1.2 Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten

Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten führte in BMSC zu einer reduzierten *COL2A1*-Genexpression nach 7 Tagen chondrogener Differenzierung im Vergleich zu BMSC in Monokultur, wohingegen nach 28 Tagen kein Unterschied mehr bestand. Die miR-675- und miR-301-Expression wurde durch die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nicht beeinflusst (Abb. 24A). Auch zwischen Tag 7 und Tag 28 gab es weder bei BMSC in Monokultur noch in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten signifikante Unterschiede in der miR-Expression. Allerdings wiesen BMSC unter beiden Kulturbedingungen an Tag 28 signifikant höhere *COL2A1*-Expressionslevel auf als an Tag 7 (Abb. 24B).

Chondrozyten, die auf OA-Knorpelexplantaten kultiviert wurden, zeigten nur in der miR-675-Expression an Tag 7 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Chondrozyten, die ohne Explantat kultiviert wurden (Abb. 24C). Weder bei der Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten noch bei der Monokultur änderten sich die miR-675-, miR-301- und *COL2A1*-Expressionslevel zwischen Tag 7 und Tag 28 (Abb. 24D).

Wurden BMSC und Chondrozyten in einem Fibringel gemischt und gemeinsam auf OA-Knorpelexplantaten kultiviert, war nur die miR-675-Expression an Tag 28 signifikant höher als im Gemisch in Monokultur (Abb. 24E). Im Vergleich zu Tag 7 war die miR-675-Expression im Gemisch in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten und die *COL2A1*-Expression im Gemisch aus BMSC und Chondrozyten in Monokultur an Tag 28 höher (Abb. 24F).

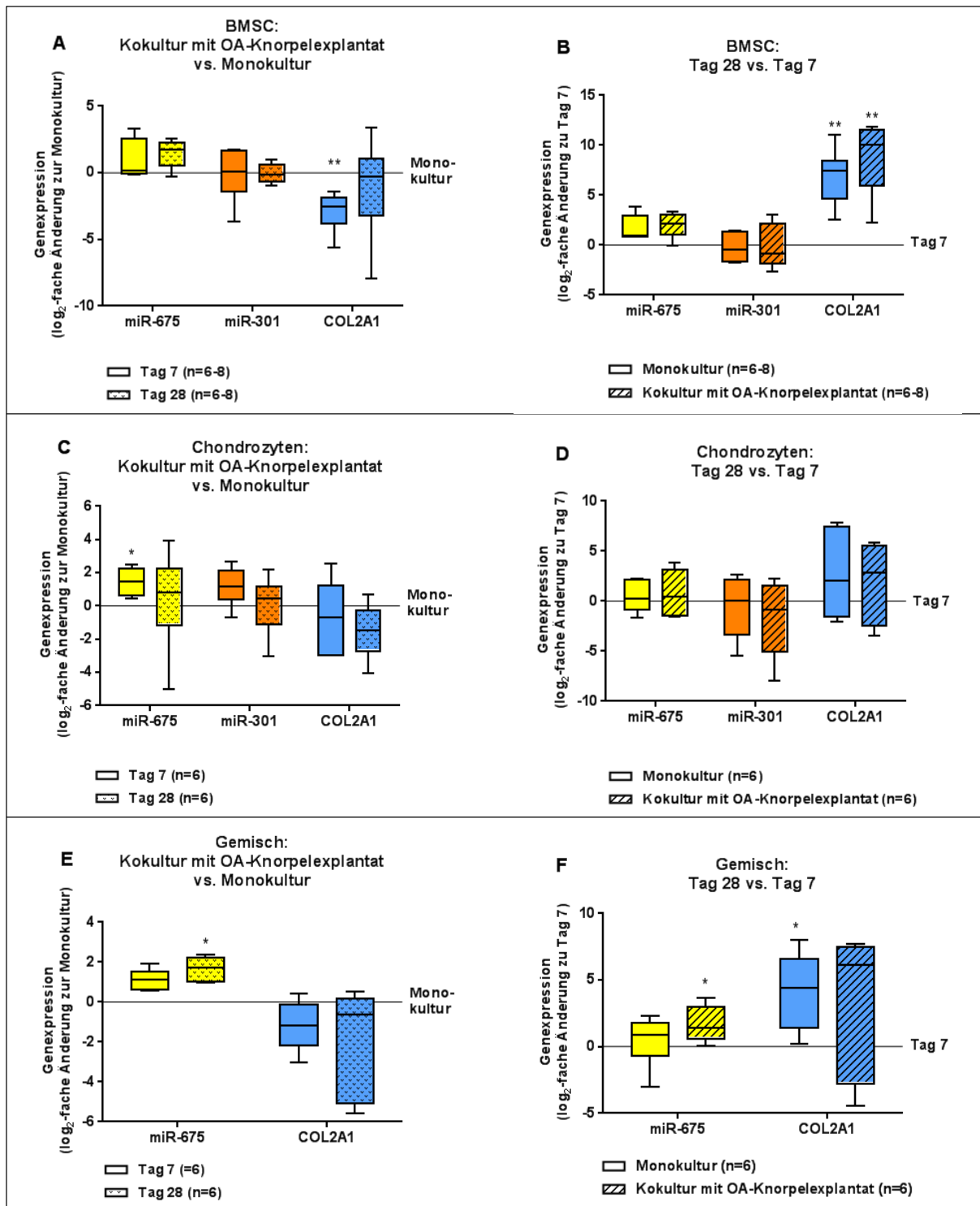


Abb. 24 Einfluss von OA-Knorpelexplantaten auf die miR-675-, miR-301- und COL2A1-Genexpression

miR-675- (gelbe Balken), miR-301- (orangene Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC (A), Chondrozyten (C) und einem Gemisch beider Zelltypen (E) in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-675- (gelbe Balken), miR-301- (orangene Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC (B), Chondrozyten (D) und einem Gemisch beider Zelltypen (F) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); *= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.4.1.3 Kokultur mit N-Knorpelexplantaten

Kokultur mit N-Knorpelexplantaten bewirkte in BMSC einen signifikanten Anstieg der miR-675-Expression an Tag 7 und eine Reduktion der *COL2A1*-mRNA-Level an beiden Zeitpunkten im Vergleich zu BMSC in Monokultur (Abb. 25A). Sowohl BMSC in Mono- als auch in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten wiesen an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 erhöhte miR-675- und *COL2A1*-Expressionslevel auf (Abb. 25B). Beim direkten Vergleich von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der miR-675- oder *COL2A1*-Expression (Abb. 25C).

Wie bei OA-Chondrozyten in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten (Abb. 24C) schien auch bei N-Chondrozyten in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten die miR-675-Expression an Tag 7 höher zu sein als bei N-Chondrozyten in Monokultur (Abb. 25D). Wegen der mangelnden Verfügbarkeit von N-Knorpelproben konnte dieses Experiment nur viermal durchgeführt werden und ergab keine signifikanten Unterschiede.

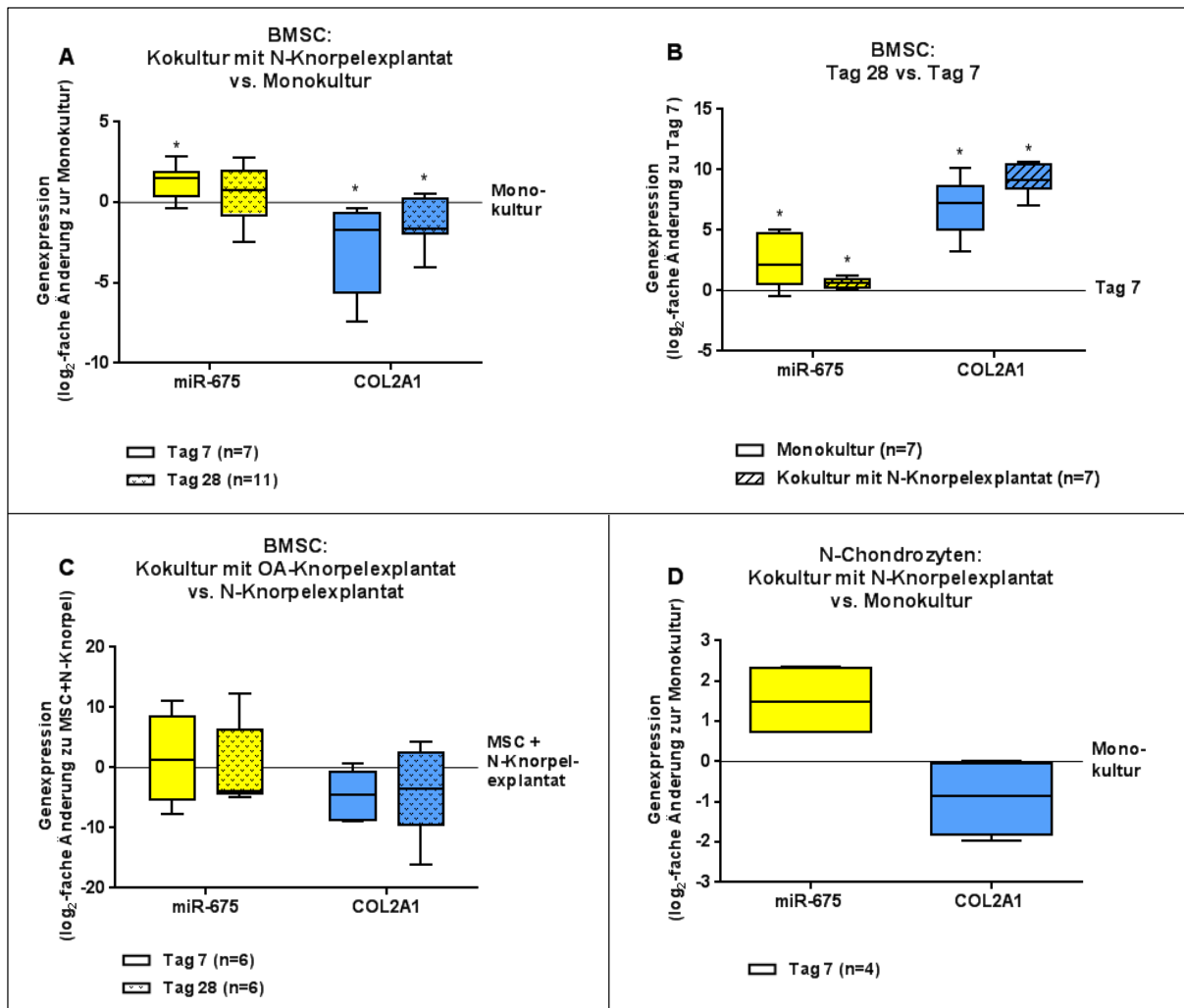


Abb. 25 Einfluss von N-Knorpelexplantaten auf die miR-675- und COL2A1-Genexpression

(A) miR-675- (gelbe Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); (B) miR-675- (gelbe Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); (C) miR-675- (gelbe Balken) und COL2A1-Genexpression (blaue Balken) von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (0-Linie); (D) miR-675- (gelber Balken) und COL2A1-Genexpression (blauer Balken) von N-Chondrozyten in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); $*=p<0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.4.2 miR-124a, SOX9 und CTGF Gen- und Proteinexpression

Die miR-124a kann sowohl im 3'-UTR der SOX9- (Cheng *et al.*, 2009) als auch der CTGF-mRNA binden (Lv *et al.*, 2011) und somit die Gen- und Proteinexpression dieser beiden Zielgene regulieren.

4.4.2.1 Kokultur mit OA-Knochenexplantaten

In BMSC führte die Kokultur mit OA-Knochenexplantaten zu einer reduzierten *CTGF*-Genexpression an Tag 28 im Vergleich zu BMSC in Monokultur (Abb. 26A). Chondrozyten, die mit OA-Knochenexplantaten kokultiviert wurden, wiesen erhöhte miR-124a-Level auf im Vergleich zu Chondrozyten in Monokultur, wobei die Expression der beiden möglichen Zielgene, *SOX9* und *CTGF*, unverändert blieb (Abb. 26C). Im Gemisch aus BMSC und Chondrozyten bewirkte die Kokultur mit OA-Knochenexplantaten an Tag 28 eine signifikante Erhöhung der miR-124a-Expression und eine signifikante Reduktion der *CTGF*-Genexpression (Abb. 26E).

Verglichen mit der Expression an Tag 7 wiesen an Tag 28 weder BMSC (Abb. 26B), noch Chondrozyten (Abb. 26D) noch das Gemisch aus beiden Zelltypen (Abb. 26F) Unterschiede in der miR-124a-, *SOX9*- oder *CTGF*-Expression auf.

4.4.2.2 Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten

Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten führte an Tag 7 und Tag 28 sowohl in BMSC (Abb. 27A) als auch in Chondrozyten (Abb. 27C) und einem Gemisch beider Zelltypen (Abb. 27E) zu einer gesteigerten miR-124a-Expression im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen. Allerdings war lediglich die *CTGF*-Expression an Tag 7 im Gemisch durch die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten reduziert. Verglichen mit der Expression an Tag 7 wiesen an Tag 28 weder BMSC (Abb. 27B), noch Chondrozyten (Abb. 27D) noch das Gemisch aus beiden Zelltypen (Abb. 27F) Unterschiede in der miR-124a-, *SOX9*- oder *CTGF*-Expression auf.

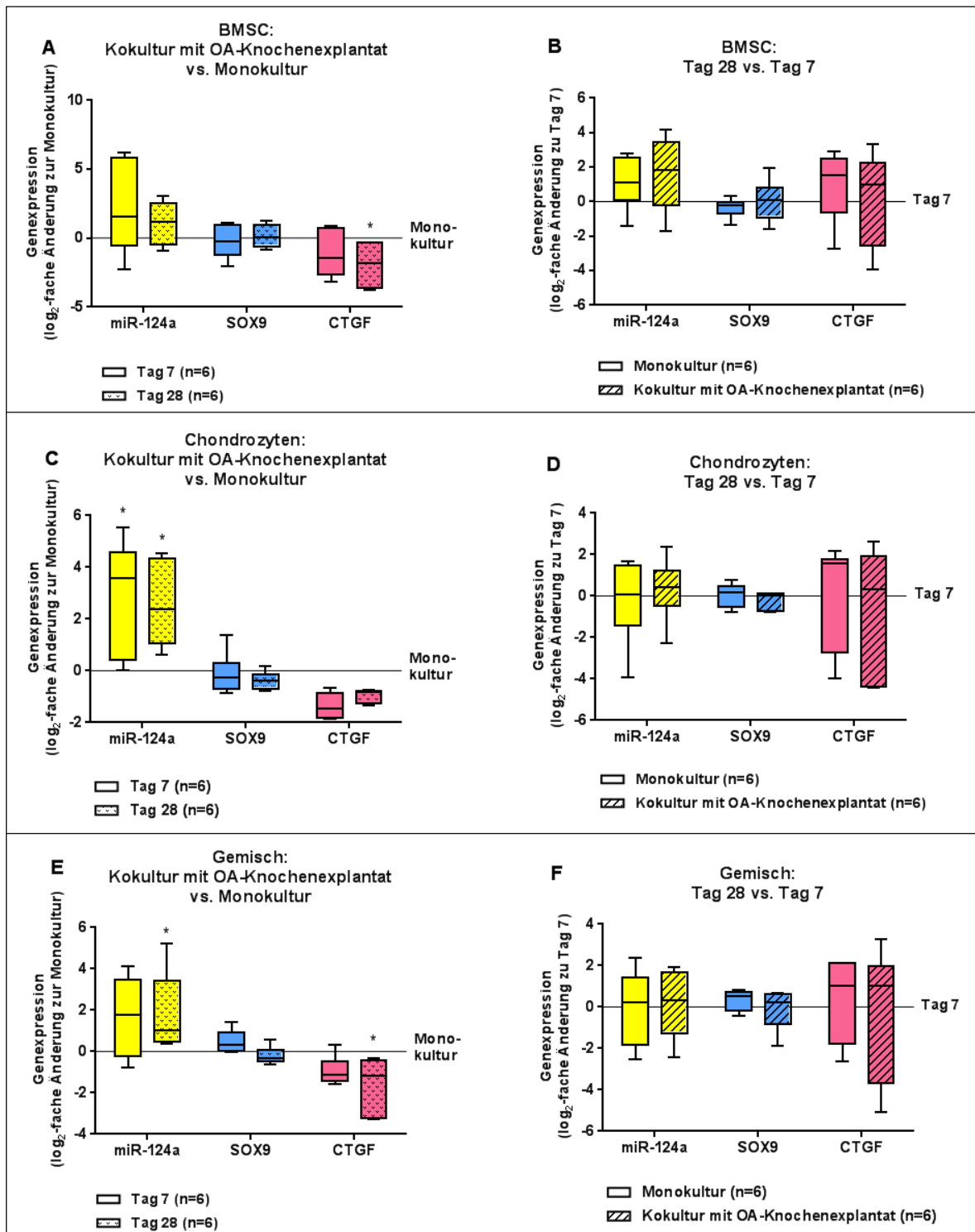


Abb. 26 Einfluss von OA-Knochenexplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression

miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (A), Chondrozyten (C) und einem Gemisch beider Zelltypen (E) in Kokultur mit OA-Knochenexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (B), Chondrozyten (D) und einem Gemisch beider Zelltypen (F) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knochenexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

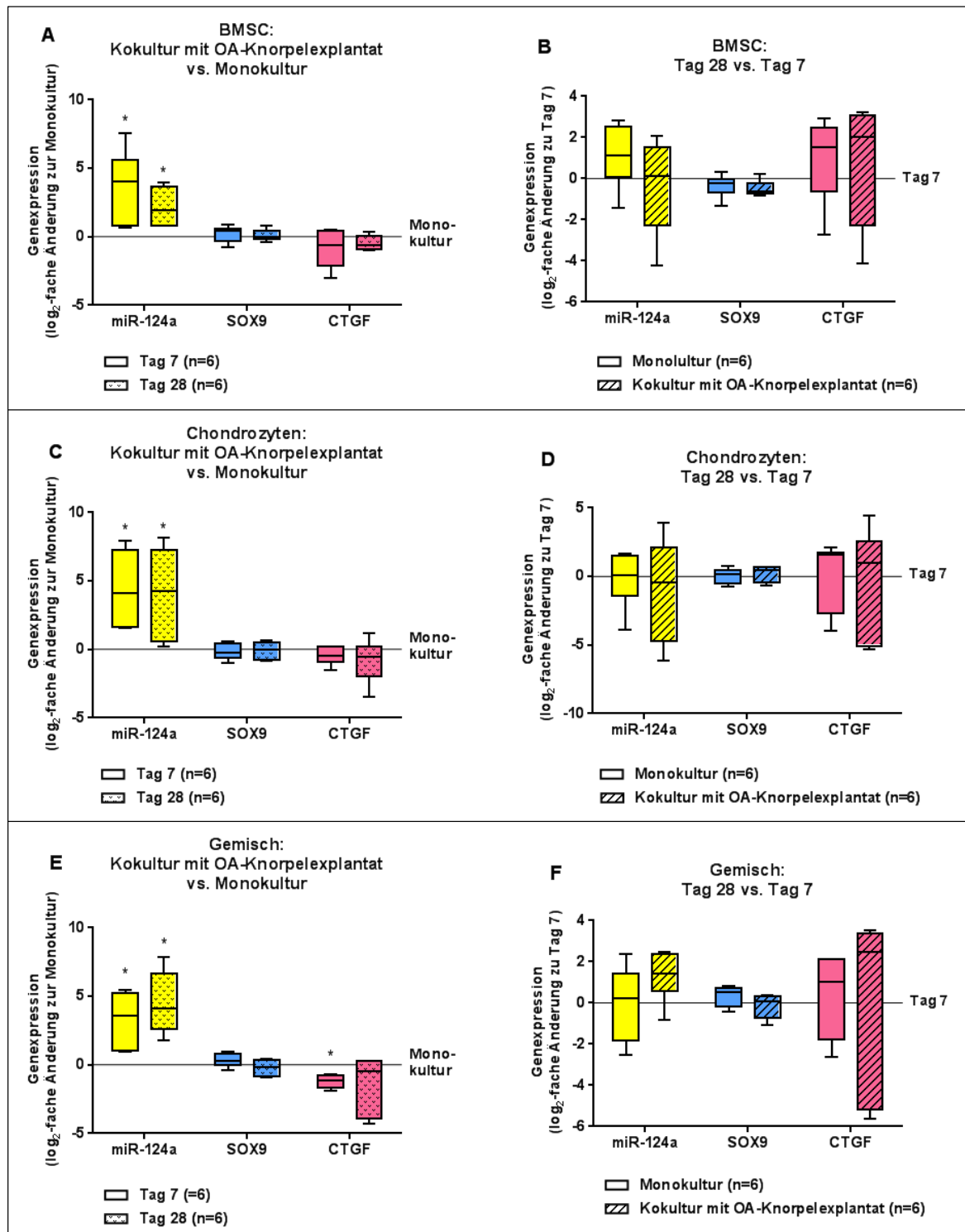


Abb. 27 Einfluss von OA-Knorpelexplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression

miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (A), Chondrozyten (C) und einem Gemisch beider Zelltypen (E) in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (B), Chondrozyten (D) und einem Gemisch beider Zelltypen (F) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); $\ast = p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

Da die Interaktion von miR und mRNA nicht zwingend zum Abbau der mRNA führen muss, sondern auch lediglich die Translation inhibiert werden kann, wurden die Proteinexpressionlevel von Sox9 und CTGF mittels Western Blotting bzw. ELISA untersucht.

Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten führte in BMSC an Tag 7 und 28 zu erhöhter Sox9-Proteinsynthese im Vergleich zu BMSC in Monokultur. Auf die Sox9-Proteinsynthese von Chondrozyten hatte das kokultivierte OA-Knorpelexplantat jedoch keinen Einfluss (Abb. 28A). Auch zwischen Tag 7 und Tag 28 gab es in BMSC und Chondrozyten weder bei Mono- noch bei Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten Unterschiede in der Sox9-Proteinexpression (Abb. 28B). Im Zellkulturüberstand von BMSC sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten wurde an Tag 28 jeweils eine signifikant höhere CTGF-Konzentration gemessen im Vergleich zu Tag 7 (Abb. 29A). Keine Unterschiede in der CTGF-Konzentration traten bei Chondrozyten auf sowie zwischen BMSC und Chondrozyten in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten. Allerdings betrug die von OA-Knorpelexplantaten sezernierte Menge an CTGF an Tag 7 und Tag 28 ca. 100 pg/mg Gesamtprotein im Überstand. Da OA-Knorpelexplantate CTGF ins Kulturmedium abgaben, könnte eine Reduktion der CTGF-Produktion kokultivierter BMSC bzw. Chondrozyten durch die erhöhten miR-124a-Level evtl. durch das vom Knorpel sezernierte CTGF überdeckt worden sein. Deshalb wurde zusätzlich die intrazelluläre CTGF-Proteinmenge im Zelllysate gemessen. Hier zeigten sich bei 3-4 Experimenten zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch war die CTGF-Menge tendenziell reduziert bei Chondrozyten in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten im Vergleich zur Monokultur (Abb. 29B). Zwischen Tag 7 und 28 bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 29C), wobei BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten an Tag 28 eher mehr CTGF zu produzieren schienen als an Tag 7.

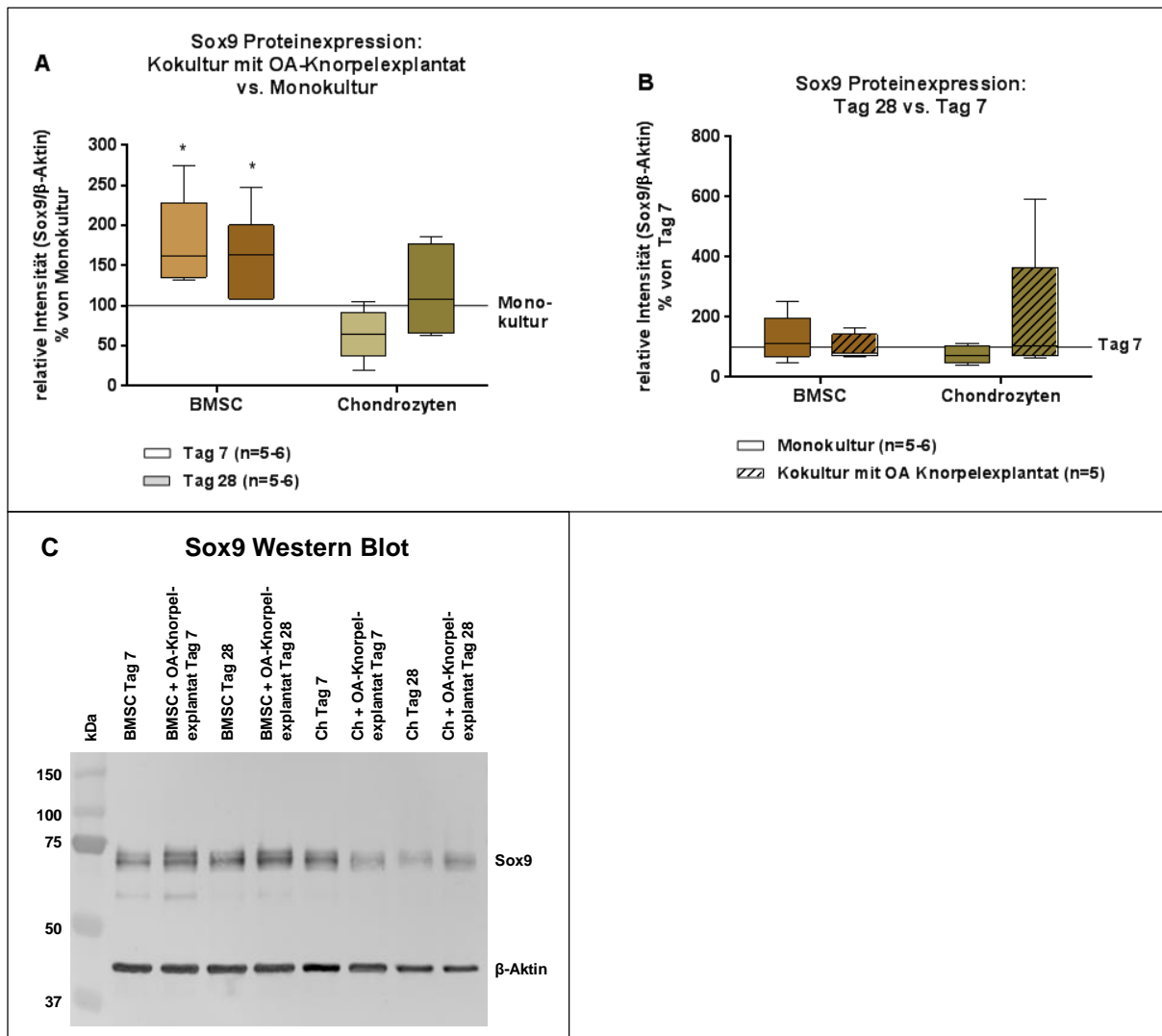


Abb. 28 Einfluss von OA-Knorpel-explantaten auf die Sox9-Proteinexpression

(A) Sox9-Proteinexpression von BMSC (braune Balken) und Chondrozyten (grüne Balken) nach 7 Tagen (helle Balken) bzw. 28 Tagen (dunkle Balken) in Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten im Vergleich zur Monokultur (Linie bei 100 %); (B) Sox9-Proteinexpression von BMSC (braune Balken) und Chondrozyten (grüne Balken) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (Linie bei 100 %); (C) Repräsentativer Sox9-Western Blot mit β -Aktin als Ladekontrolle von Zelllysaten aus BMSC bzw. Chondrozyten (Ch) in Fibringel in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten nach 7 und 28 Tagen; kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards; $*=p<0,05$; signifikanter Unterschied zur Monokultur (Linie bei 100 %); nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

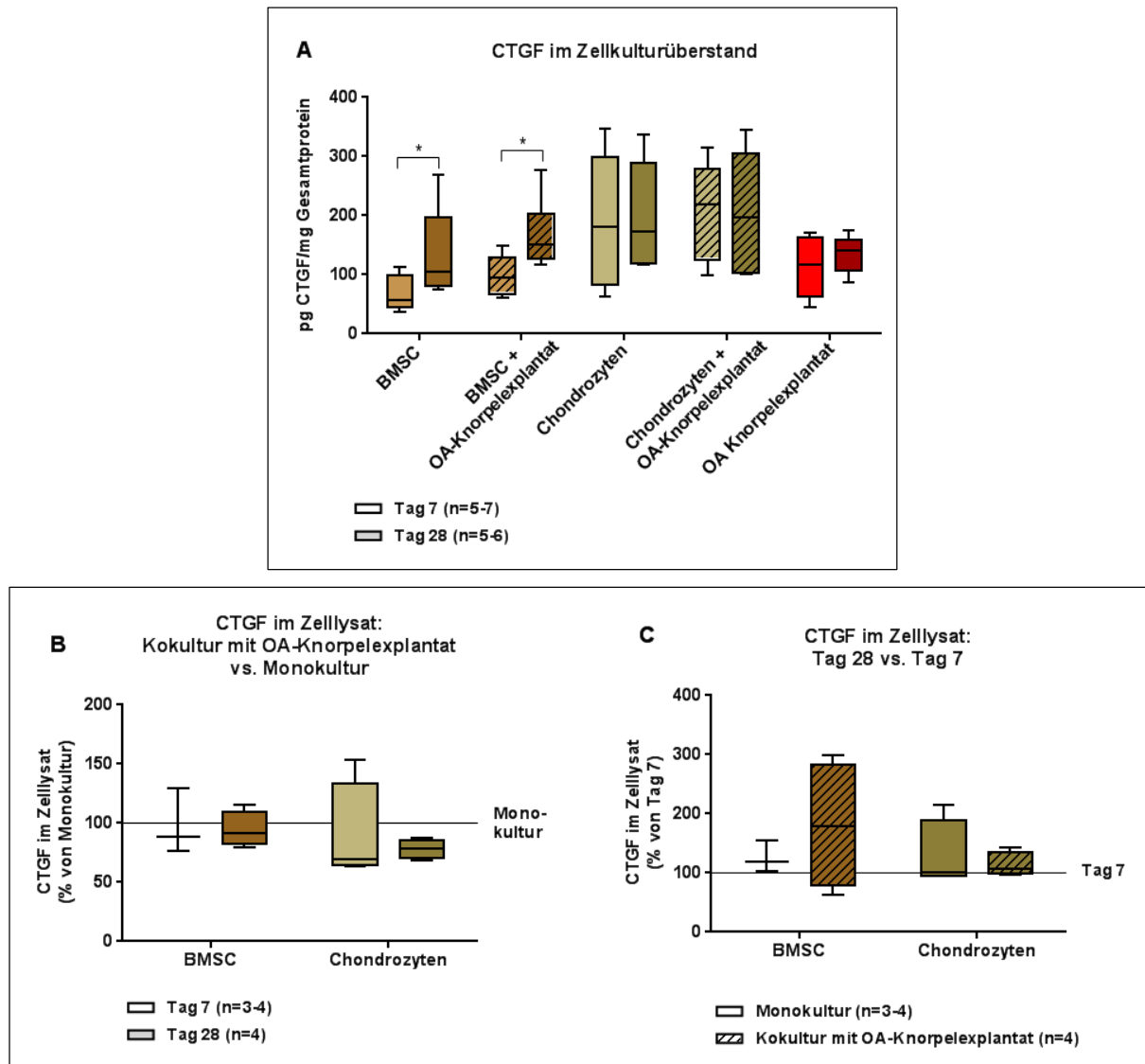


Abb. 29 Einfluss von OA-Knorpelexplantaten auf die CTGF-Proteinexpression

(A) CTGF-Konzentration im Zellkulturüberstand von BMSC (braune Balken), Chondrozyten (grüne Balken) und OA-Knorpelexplantaten (rote Balken) nach 7 Tagen (helle Balken) bzw. 28 Tagen (dunkle Balken) in Mono- oder Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten; (B) CTGF-Proteinexpression von BMSC (braune Balken) und Chondrozyten (grüne Balken) nach 7 Tagen (helle Balken) bzw. 28 Tagen (dunkle Balken) in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten im Vergleich zur Monokultur (Linie bei 100 %); (C) CTGF-Proteinexpression von BMSC (braune Balken) und Chondrozyten (grüne Balken) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (Linie bei 100 %); * $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zwischen den angezeigten Balken; nicht-parametrischer Mann Whitney Test.

4.4.2.3 Kokultur mit N-Knorpelexplantaten

BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten wiesen nach 7 und 28 Tagen chondrogener Differenzierung höhere miR-124a- und an Tag 28 auch höhere SOX9-Genexpressionslevel auf als BMSC in Monokultur, wohingegen die CTGF-Genexpression durch das kokultivierte N-Knorpelexplantaten unverändert blieb (Abb. 30A). Im Vergleich zu Tag 7 zeigten BMSC sowohl in Mono- als auch in Kokultur an Tag 28 höhere CTGF-Level (Abb. 30B). In der miR-124a- und SOX9-Genexpression gab es keine Unterschiede zwischen Tag 7 und Tag 28. In BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten war die CTGF-Genexpression an Tag 7 im Vergleich zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten signifikant niedriger (Abb. 30C), wobei dieser Unterschied an Tag 28 nicht mehr auftrat. Ebenso gab es keine Unterschiede in der miR-124a- und SOX9-Genexpression zwischen der Kokultur mit OA-Knorpel- und der mit N-Knorpelexplantaten. N-Chondrozyten in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten wiesen tendenziell höhere miR-124a-Genexpressionslevel auf als N-Chondrozyten in Monokultur (Abb. 30D), wobei sich bei der Genexpression von SOX9 kein Trend abzeichnete.

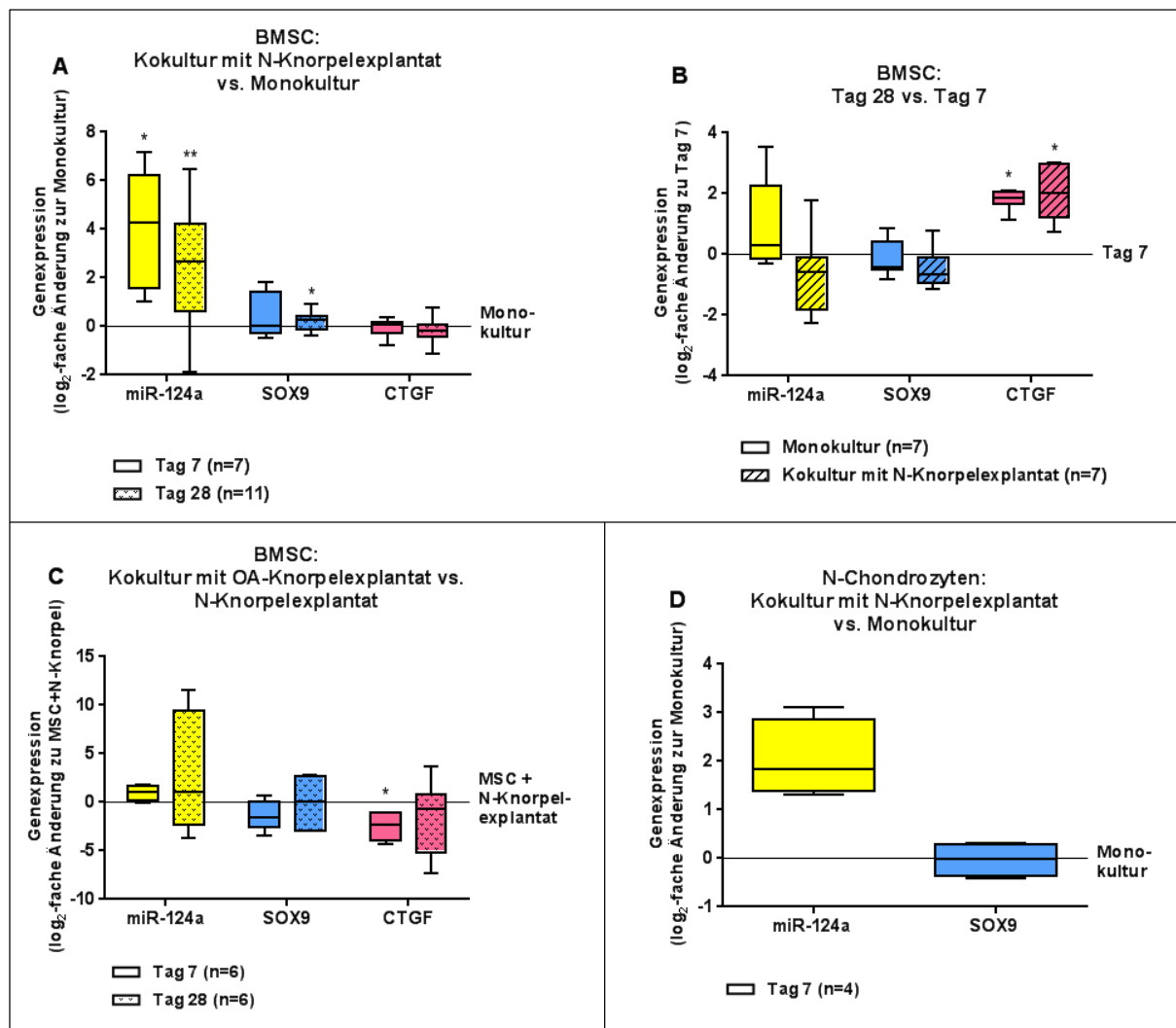


Abb. 30 Einfluss von N-Knorpelexplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression (A) miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); (B) miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); (C) miR-124a- (gelbe Balken), SOX9- (blaue Balken) und CTGF-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (0-Linie); (D) miR-124a- (gelber Balken) und SOX9-Genexpression (blauer Balken) von N-Chondrozyten in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); *= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.4.3 miR-29b, COL1A1 und COL3A1 Gen- und Proteinexpression

miR-29b kann sowohl die Expression von Kollagen I als auch von Kollagen III regulieren, da es Bindestellen in der 3'-UTR der mRNAs beider Zielgene gibt (Steele *et al.*, 2010).

4.4.3.1 Kokultur mit OA-Knochenexplantaten

OA-Knochenexplantate hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von miR-29b, COL1A1 und COL3A1 in kokultivierten BMSC (Abb. 31A). Auch zwischen Tag 7 und Tag 28 blieben die Expressionslevel der miR und ihrer potentiellen Zielgene in BMSC sowohl in Mono- als auch in Kokultur mit OA-Knochenexplantaten unverändert (Abb. 31B).

Chondrozyten, die für 28 Tage auf OA-Knochenexplantaten kokultiviert wurden, wiesen niedrigere COL3A1-Level auf als Chondrozyten in Monokultur (Abb. 31C). Keine Unterschiede traten in der miR-29b- und COL1A1-Genexpression auf. Die Expression aller drei untersuchten Gene änderte sich weder in mono- noch in kokultivierten Chondrozyten zwischen Tag 7 und Tag 28 (Abb. 31D).

Wurden BMSC und Chondrozyten in einem Fibringel gemischt und gemeinsam auf OA-Knochenexplantaten kokultiviert, zeigte dieses Zellgemisch nach 7 Tagen niedrigere COL3A1-Genexpressionslevel und nach 28 Tagen niedrigere COL1A1-Level im Vergleich zum Gemisch beider Zelltypen in Monokultur (Abb. 31E). Zwischen Tag 7 und Tag 28 traten keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 31F).

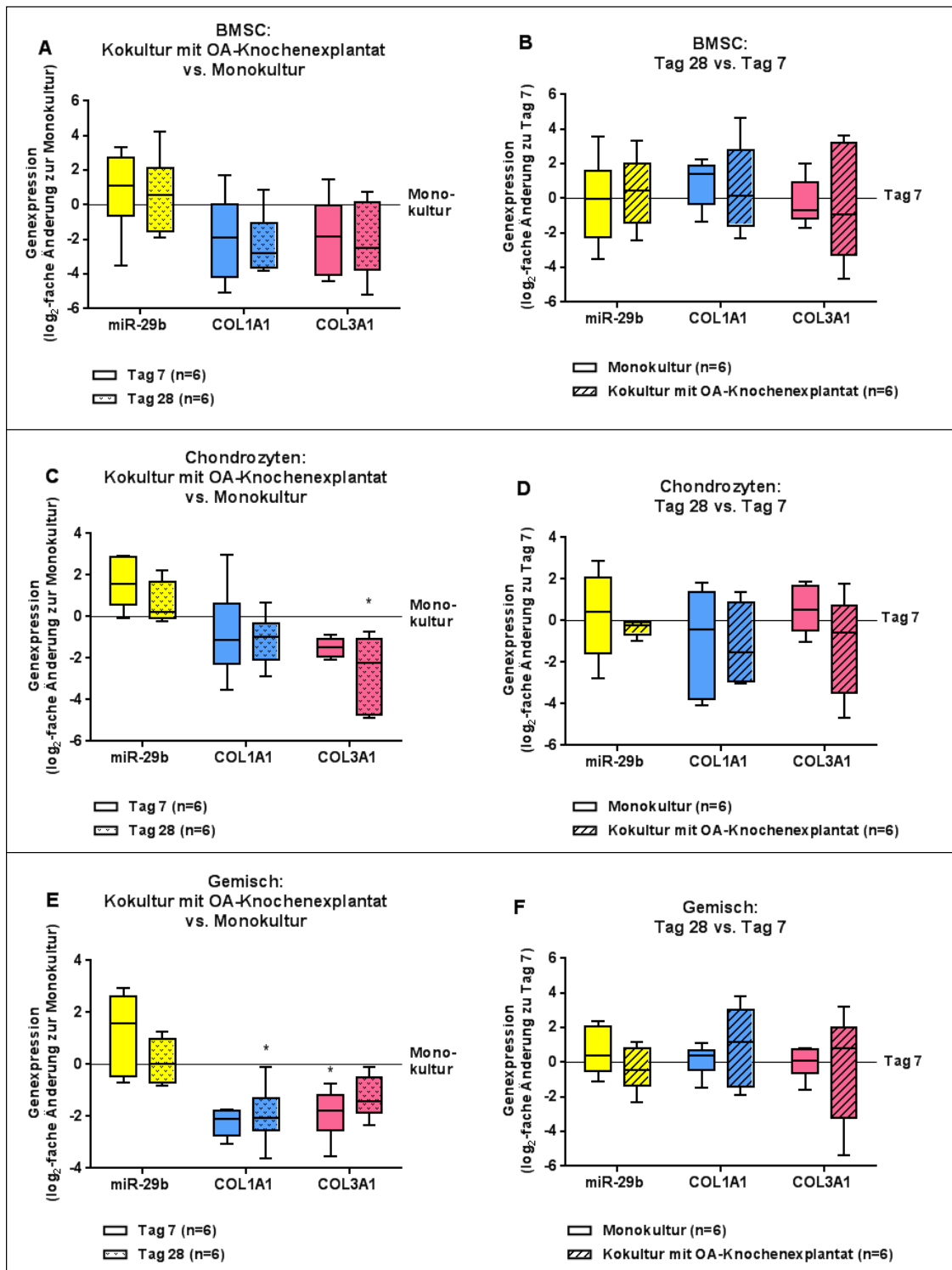


Abb. 31 Einfluss von OA-Knochenexplantaten auf die miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression

miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (**A**), Chondrozyten (**C**) und einem Gemisch beider Zelltypen (**E**) in Kokultur mit OA-Knochenexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (**B**), Chondrozyten (**D**) und einem Gemisch beider Zelltypen (**F**) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knochenexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.4.3.2 Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten

Genexpression

Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten führte in BMSC zu erhöhter miR-29b-Expression an Tag 7 und erniedrigter *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression an beiden Zeitpunkten verglichen mit der Expression von BMSC in Monokultur (Abb. 32A). In Chondrozyten erhöhte sich durch die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten die miR-29b-Expression an beiden Zeitpunkten, wohingegen die *COL1A1*- und *COL3A1*-Expression im Vergleich zu Chondrozyten in Monokultur unverändert blieb (Abb. 32C). Wurde ein Gemisch aus BMSC und Chondrozyten auf OA-Knorpelexplantaten kultiviert, zeigten sich niedrigere *COL1A1*- und *COL3A1*-Expressionslevel im Vergleich zum Zellgemisch in Monokultur (Abb. 32E).

Zwischen Tag 7 und Tag 28 gab es weder in BMSC (Abb. 32B) noch in Chondrozyten (Abb. 32D) oder dem Gemisch (Abb. 32F) in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten signifikante Unterschiede in der miR-29b-, *COL1A1*- oder *COL3A1*-Genexpression.

Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob die durch Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten erhöhte miR-29b- und erniedrigte *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression in BMSC Auswirkungen auf die Kollagen-Proteinsynthese und -sekretion hat, wurden aus dem Zellkulturüberstand von BMSC in Fibringel in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten Kollagene extrahiert und sezerniertes Kollagen I mittels Western Blotting analysiert. Weder an Tag 7 noch an Tag 28 traten signifikante Unterschiede bei Kollagen I im Überstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten im Vergleich zur Monokultur auf (Abb. 33).

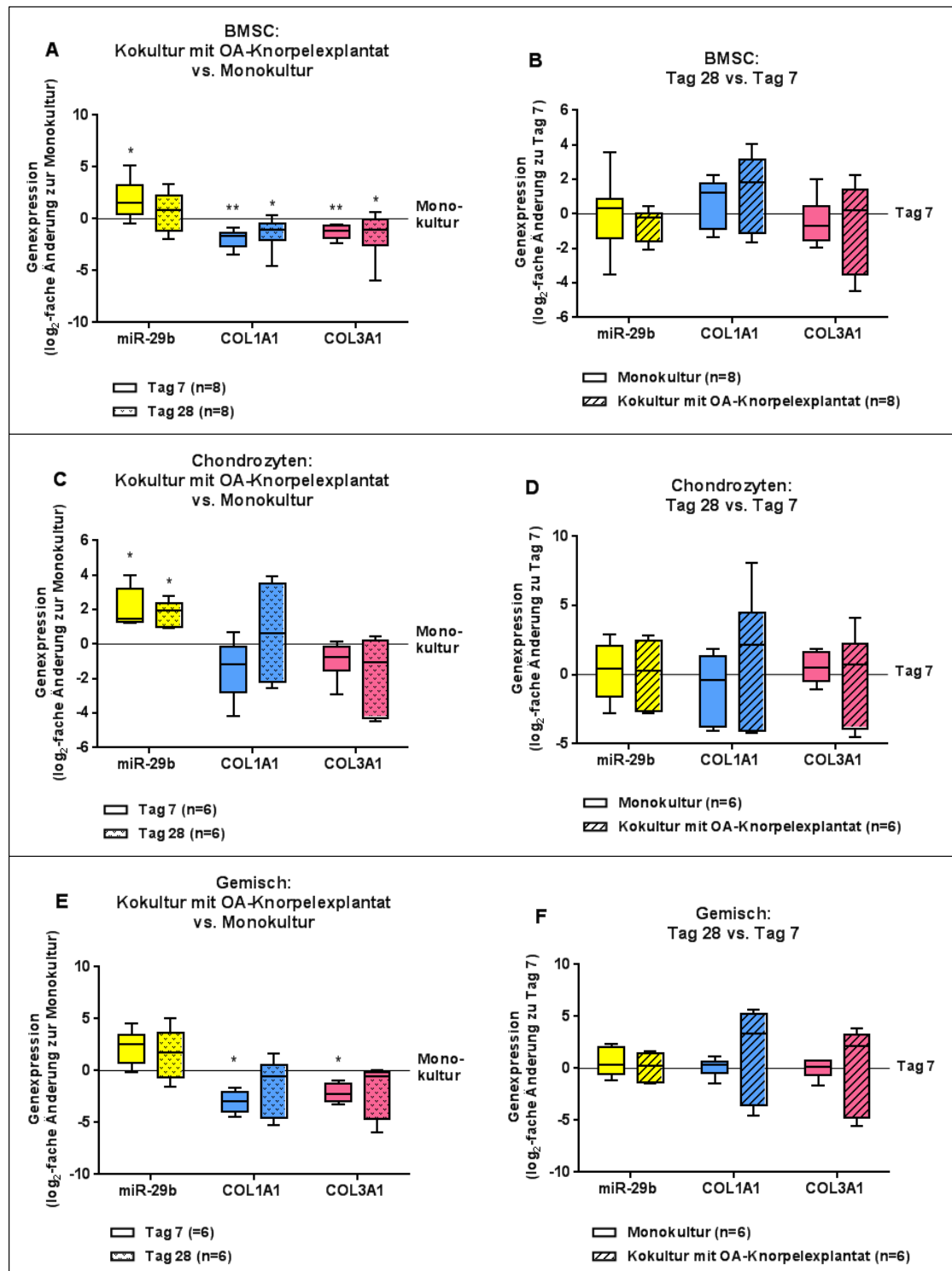


Abb. 32 Einfluss von OA-Knorpelexplantaten auf miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression

miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (A), Chondrozyten (C) und einem Gemisch beider Zelltypen (E) in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC (B), Chondrozyten (D) und einem Gemisch beider Zelltypen (F) in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); *= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

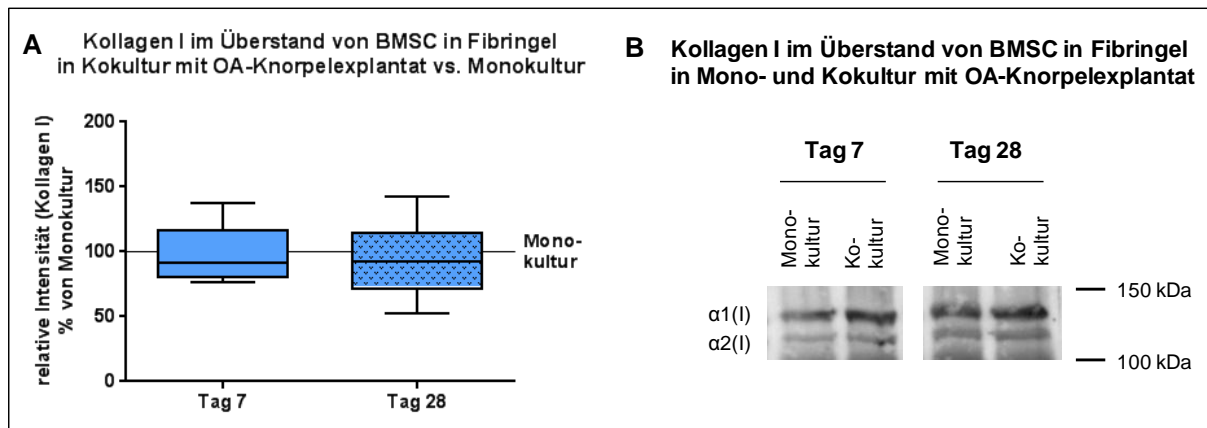


Abb. 33 Einfluss von OA-Knorpelexplantaten auf die Kollagen I-Proteinsekretion kokultivierter BMSC

(A) sezerniertes Kollagen I im Überstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten an Tag 7 (Balken ohne Muster) und Tag 28 (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (Linie bei 100 %); (B) Repräsentativer Kollagen I-Western Blot mit Kollagenextrakten aus Zellkulturüberstand von BMSC in Fibringel in Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 und 28 Tagen; $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$: Proteinbande der alpha1 und 2 Kette von Kollagen I; kDa: Molekulargewicht des Proteinstandards.

4.4.3.3 Kokultur mit N-Knorpelexplantaten

Kokultur mit N-Knorpelexplantaten steigerte in BMSC die miR-29b-Expression und reduzierte die *COL1A1*-Genexpression nach 7 und 28 Tagen im Vergleich zu monokultivierten BMSC, wobei die *COL3A1*-Level unverändert blieben (Abb. 34A). Zwischen den beiden Zeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der Expression von miR-29b, *COL1A1* und *COL3A1* in Mono- oder Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (Abb. 34B). Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen BMSC in Kokultur mit OA- und BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (Abb. 34C).

Chondrozyten, die aus N-Knorpel isoliert wurden und anschließend auf N-Knorpel-explantaten kultiviert wurden, wiesen zwar höhere miR-29b-Expressionslevel auf verglichen mit N-Chondrozyten, die ohne Explantat kultiviert wurden (Abb. 34D), aber der Unterschied war wegen der geringen Anzahl an Versuchen (n=4) nicht signifikant. In der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression zeichnete sich kein Trend ab.

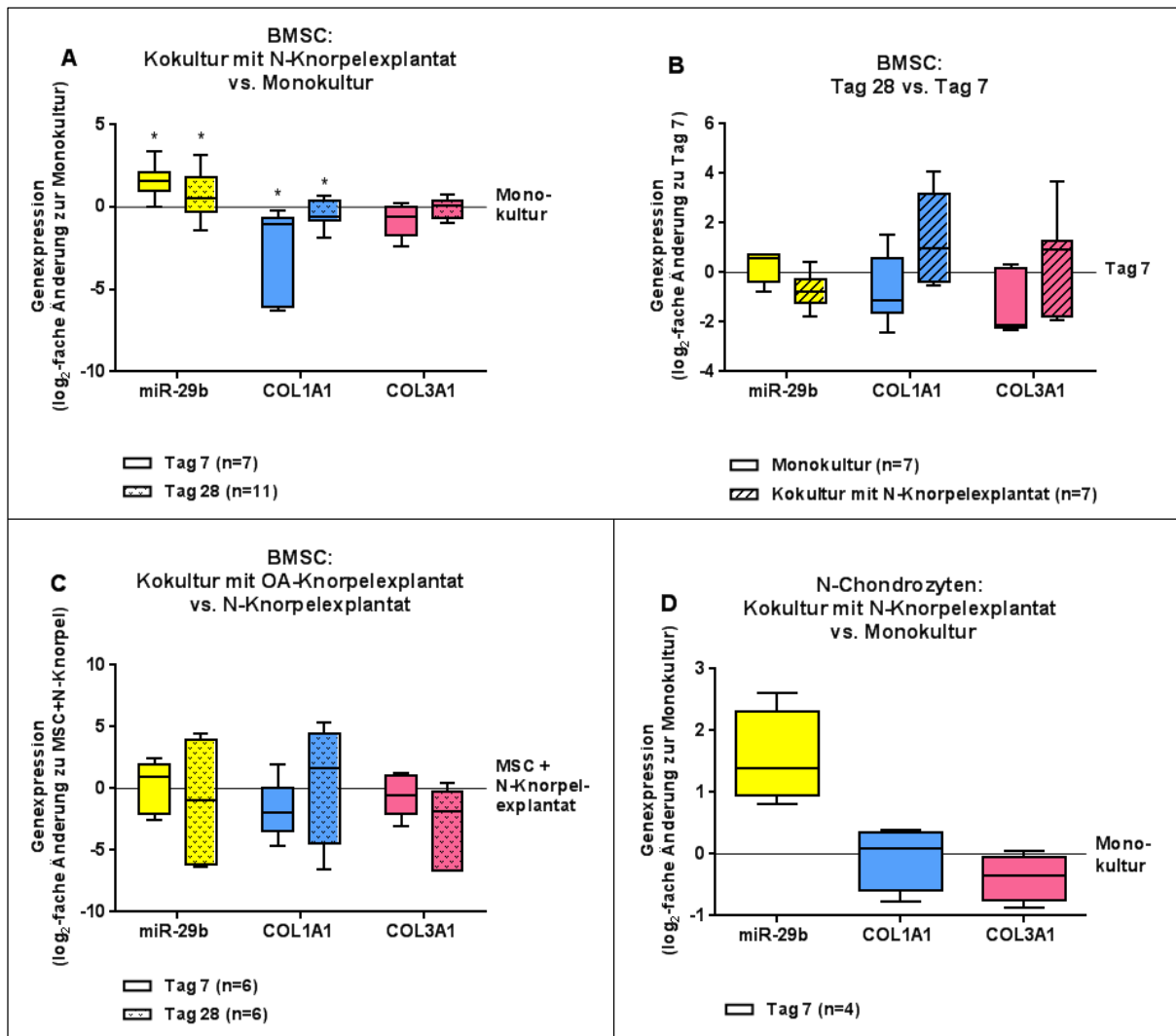


Abb. 34 Einfluss von N-Knorpelexplantaten auf die miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression

(A) miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); (B) miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Monokultur (Balken ohne Muster) und Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (Balken mit Muster) an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 (0-Linie); (C) miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen (Balken ohne Muster) bzw. 28 Tagen (Balken mit Muster) im Vergleich zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten (0-Linie); (D) miR-29b- (gelber Balken), COL1A1- (blauer Balken) und COL3A1-Genexpression (pinker Balken) von N-Chondrozyten in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten nach 7 Tagen im Vergleich zur Monokultur (0-Linie); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.5 Einfluss der miR-29b auf die Expression der Kollagene I und III in chondrogen differenzierenden BMSC in einer OA-Umgebung

4.5.1 Lösliche, von OA-Knorpelexplantaten abgegebene Faktoren fördern die miR-29b-Expression in kokultivierten BMSC und hemmen die Kollagen I und III Genexpression und Proteinsekretion

Um zu untersuchen, ob die Induktion der miR-29b-Expression und die damit einhergehende Inhibition der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression in BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten durch lösliche, vom Knorpel ins Kulturmedium abgegebene Faktoren vermittelt wird, oder ob der direkte Kontakt zum Knorpel notwendig ist, wurden BMSC als Micromass Pellets für 7 Tage in chondrogenem Medium kultiviert, welches zuvor mit einem OA-Knorpelexplantat für zwei Tage konditioniert wurde (KM), bzw. in nicht-konditioniertem Medium (NM). Auch diese indirekte Kokultur führte zu höherer miR-29b-Expression und niedrigerer *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression von BMSC in KM im Vergleich zu BMSC in NM (Abb. 35A). Auf Proteinebene stellte sich mittels Western Blots mit Kollagenextrakten aus Zellkulturüberständen von BMSC in KM bzw. NM heraus, dass BMSC in KM ca. 50 % weniger Kollagen I sezernierten als BMSC in NM (Abb. 35B, C). Die Sekretion von Kollagen III, was sich am Detektionslimit befand, wurde durch Kultur in KM nach 7 Tagen hingegen nicht beeinflusst.

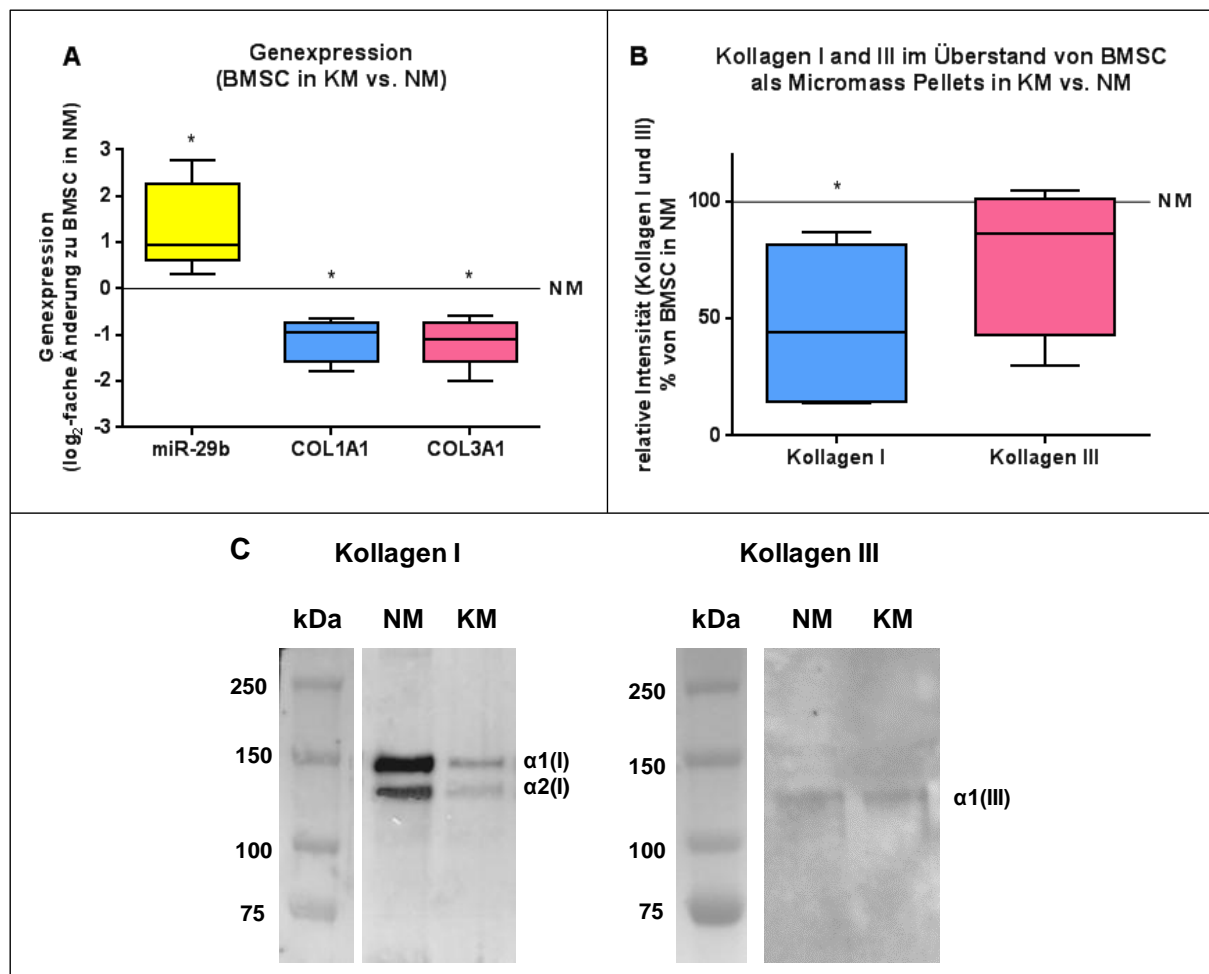


Abb. 35 Genexpression und Proteinsekretion von BMSC in KM

(A) miR-29b- (gelber Balken), COL1A1- (blauer Balken) und COL3A1-Genexpression (pinker Balken) von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tag in chondrogenem Medium, welches mit OA-Knorpel-explantaten konditioniert wurde (KM), kultiviert wurden im Vergleich zu BMSC, die als Micromass Pellets in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert wurden (0-Linie);

(B) Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden der alpha1 und alpha2 Ketten von Kollagen I (blauer Balken) und Kollagen III (pinker Balken) von Western Blots mit Kollagenextrakten aus Zellkulturüberständen von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tag in KM kultiviert wurden relativ zur Kultur in NM (Linie bei 100 %);

(C) Repräsentative Kollagen I und III Western Blot-Bilder von Kollagenextrakten aus Zellkulturüberständen von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tage in NM und KM kultiviert wurden;

*= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Linie bei 0 bzw. 100 %; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.5.2 miR-29b reguliert die *COL1A1* und *COL3A1* mRNA- und Proteinsynthese

Um zu verifizieren, dass die durch Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten gesteigerte miR-29b-Expression für die Reduktion der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression in BMSC verantwortlich ist, wurde durch Transfektion mit einem miR-29b-Mimic die miR-29b in BMSC überexprimiert. Bei dem Mimic handelt es sich um eine kurze, chemisch modifizierte doppelsträngige RNA, die die endogene miR "nachahmt" (engl. *to mimic*). Nach erfolgreicher Transfektion ließen sich erwartungsgemäß höhere miR-29b-Level detektieren (Abb. 36A) und die *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression war niedriger als in BMSC, die mit einer Kontroll-miR mit zufälliger Basensequenz transfiziert wurden (NT-miR, *non-targeting* Kontroll-miR). Die Überexpression von miR-29b durch die Transfektion von BMSC mit dem Mimic führte auf Proteinebene zu einer deutlichen Inhibition der Kollagen I und III Proteinsynthese (Abb. 36B). Um zu bestätigen, dass die höheren miR-29b-Level zu der Reduktion der *COL1A1*- und *COL3A1*-Expression in BMSC kultiviert mit OA-Knorpelexplantaten beitragen, wurden BMSC mit einem miR-29b-Inhibitor bzw. einer NT-miR transfiziert. Bei dem Inhibitor handelt es sich um ein kurzes, chemisch modifiziertes einzelsträngiges RNA-Molekül, das so designed wurde, dass es endogene miR-29b-Moleküle spezifisch bindet und dadurch inhibiert. Dies führt zu einer Hemmung der miR-Aktivität, indem die Bindung der durch den Inhibitor blockierten miR an ihre Ziel-mRNA verhindert wird. Nach der Transfektion mit dem Inhibitor bzw. der NT-miR wurden die BMSC für 7 Tage in konditioniertem chondrogenen Medium kultiviert (KM). Im Vergleich zu NT-miR-transfizierten BMSC, in denen es durch das konditionierte Medium zur Hochregulation der miR-29b-Expression und dadurch zur Inhibition der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression kommt, zeigten mit miR-29b-Inhibitor transfizierte BMSC, die in KM kultiviert wurden, niedrigere miR-29b-Level und höhere *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpressionslevel (Abb. 36C).

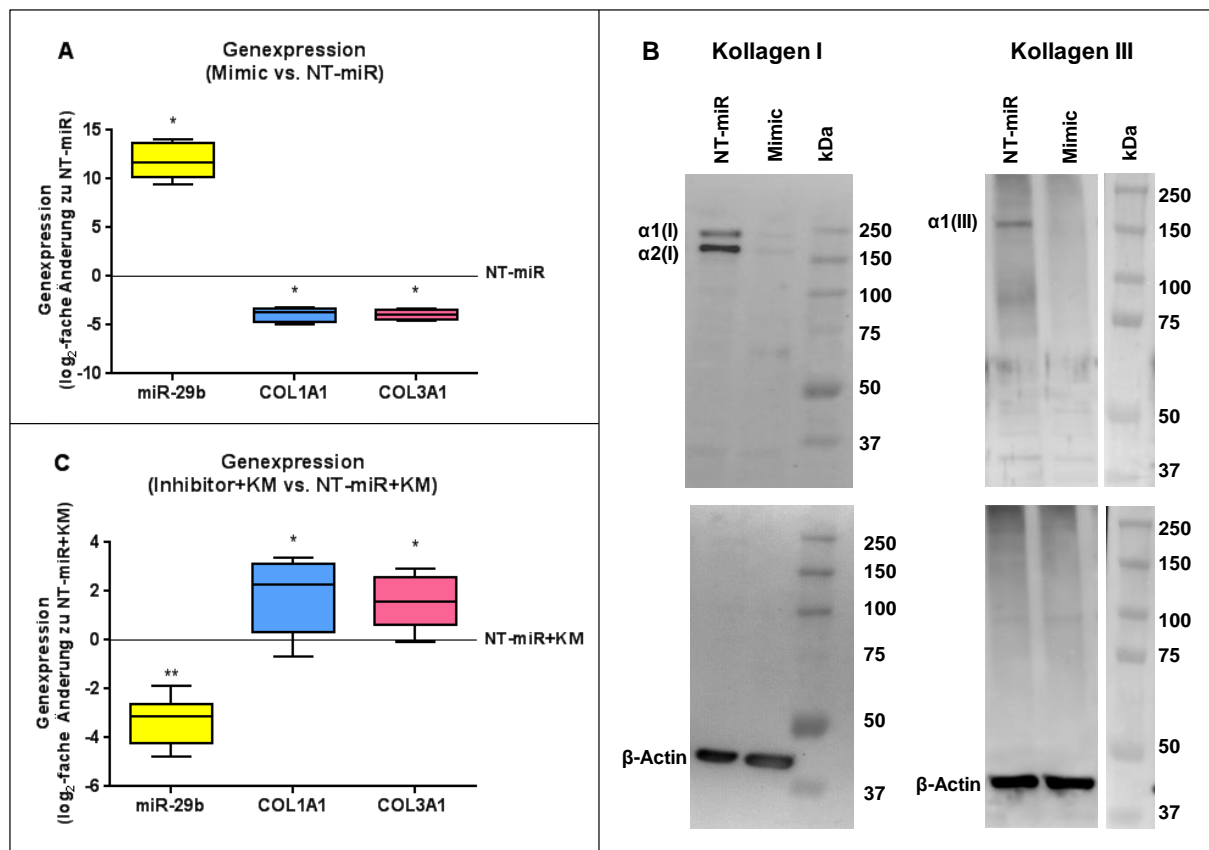


Abb. 36 Gen- und Proteinexpression von Kollagen I und III in BMSC nach Transfektion mit miR-29b-Mimic und Inhibitor

(A) miR-29b- (gelber Balken), COL1A1- (blauer Balken) und COL3A1-Genexpression (pinker Balken) von BMSC in Monolayer, die mit einem miR-29b-Mimic transfiziert wurden, im Vergleich zu BMSC, die mit einer *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) transfiziert wurden (0-Linie);

(B) Repräsentative Kollagen I und III Western Blots mit den entsprechenden β-Aktin Blots als Ladekontrollen von Zelllysaten aus BMSC in Monolayer, die mit einem miR-29b-Mimic bzw. einer NT-miR transfiziert wurden;

(C) miR-29b- (gelber Balken), COL1A1- (blauer Balken) und COL3A1-Genexpression (pinker Balken) von BMSC, die in Monolayer mit einem miR-29b-Inhibitor transfiziert und anschließend als Micromass Pellets für 7 Tage in konditioniertem Medium (KM) kultiviert wurden im Vergleich zu BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert und in KM kultiviert wurden (0-Linie);

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.5.3 miR-29b fördert die Apoptose von BMSC, reguliert aber nicht deren Proliferation

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die Kollagenexpression, hat die miR-29b auch einen modulatorischen Einfluss auf das Überleben von BMSC in der OA-Umgebung. BMSC, die in konditioniertem Medium kultiviert wurden (KM), zeigten im Vergleich zu BMSC in nicht-konditioniertem Medium (NM) eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 3 und 7, was mit einer erhöhten Apoptoserate korreliert (Abb. 37A). Ebenso führte eine miR-29b-Überexpression in BMSC durch Transfektion mit einem miR-29b-Mimic zu erhöhter Caspase-3/7 Aktivität verglichen mit NT-miR-transfizierten BMSC (Abb. 37B). Um zu überprüfen, ob die durch Kultivierung in KM induzierte erhöhte miR-29b-Expression zur gesteigerten Apoptoserate beiträgt, wurde die Caspase-3/7-Aktivität von BMSC gemessen, die mit einem miR-29b-Inhibitor bzw. einer NT-miR transfiziert und anschließend in KM kultiviert wurden. Das Blockieren der miR-29b durch den Inhibitor führte zu signifikant reduzierter Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zu NT-miR-transfizierten BMSC (Abb. 37C).

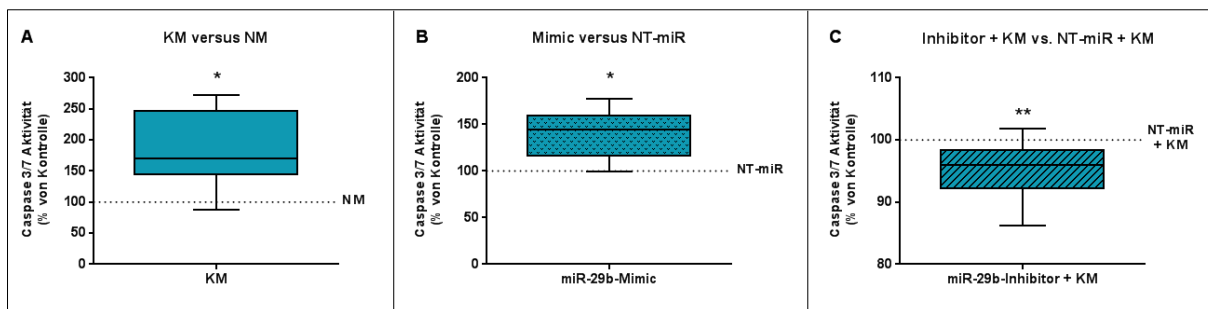


Abb. 37 Quantifizierung der Caspase-3/7-Aktivität von BMSC

(A) Caspase-3/7-Aktivität von BMSC in Monolayerkultur in konditioniertem chondrogenen Medium (KM), relativ zur Caspaseaktivität von BMSC in nicht-konditioniertem Medium (NM, Linie bei 100 %, n=8); (B) Caspase-3/7-Aktivität von BMSC in Monolayerkultur nach Transfektion mit einem miR-29b-Mimic relativ zu BMSC, die mit einer *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) transfiziert wurden (Linie bei 100 %, n=8); (C) Caspase-3/7-Aktivität von BMSC in Monolayerkultur, die mit einem miR-29b-Inhibitor transfiziert und anschließend in KM kultiviert wurden im Vergleich zu BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert und in KM kultiviert wurden (Linie bei 100 %, n=10); *= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Linie bei 100 %; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

Ein möglicher Mechanismus, durch den miR-29b die Apoptoserate beeinflussen könnte, ist die Modulation der Expression von apoptotischen Regulatoren wie die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1, welche beide bestätigte Zielgene von Mitgliedern der miR-29-Familie sind (Xiong *et al.*, 2010). Wurden BMSC als Micromass Pellets in KM kultiviert, wiesen sie signifikant niedrigere *BCL2*-Genexpressionslevel auf als BMSC, die in NM kultiviert wurden, wobei in der *MCL1*-

Genexpression keine Unterschiede auftraten (Abb. 38A). Transfektion mit einem miR-29b-Mimic führte zu reduzierten *BCL2*- und *MCL1*-Expressionslevel im Vergleich zu BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert wurden (Abb. 38B). Das Blockieren der miR-29b durch Transfektion eines miR-29b-Inhibitors und anschließender Kultivierung in KM reduzierte die miR-29b-Level und resultierte in erhöhten *MCL1*-Level, wohingegen die *BCL2*-Genexpression unverändert blieb im Vergleich zu BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert und in KM kultiviert wurden (Abb. 38C).

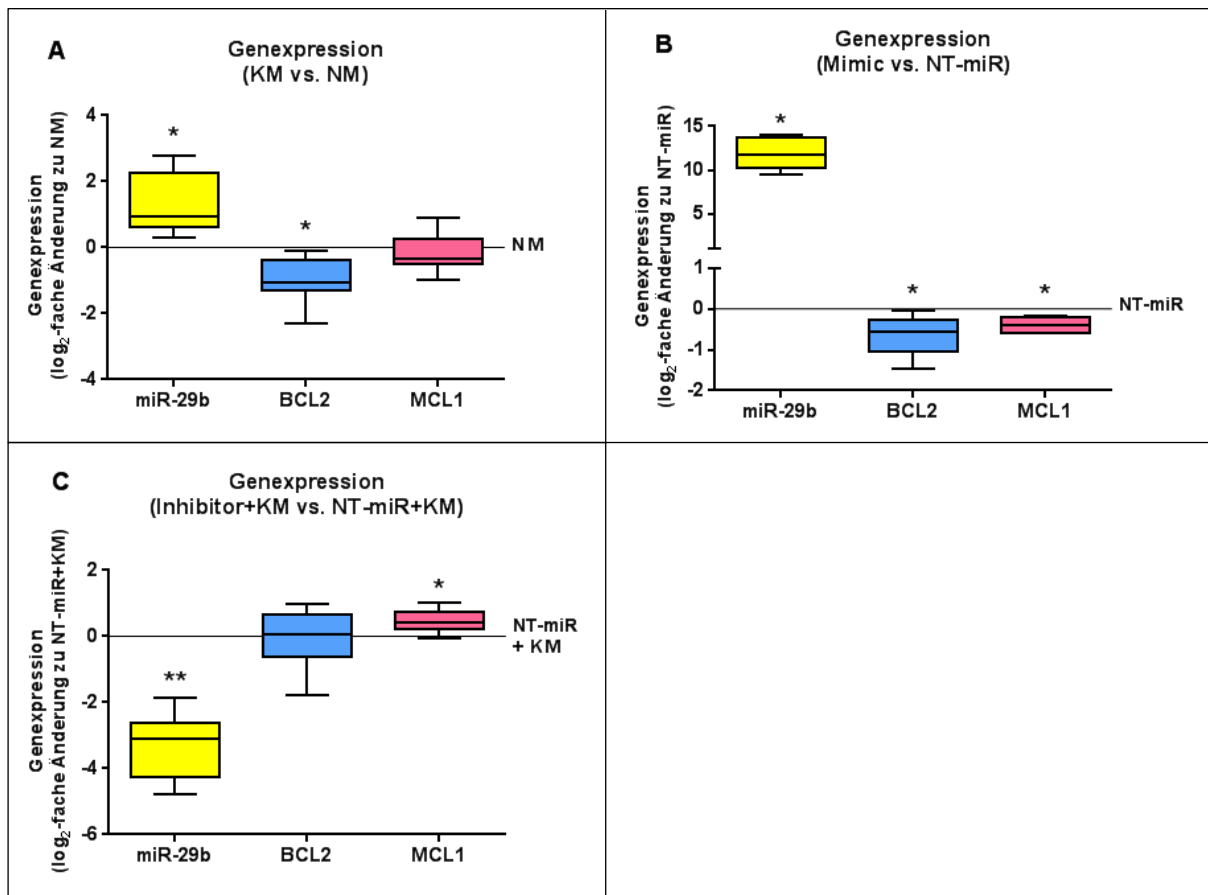


Abb. 38 Expression von Genen, die mit der Regulation der Apoptose in Verbindung stehen

(A) miR-29b- (gelber Balken), *BCL2*- (blauer Balken) und *MCL1*-Genexpression (pinker Balken) von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tage in konditioniertem chondrogenen Medium (KM) kultiviert wurden im Vergleich zu BMSC, die als Micromass Pellets in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert wurden (0-Linie, n=7); (B) miR-29b- (gelber Balken), *BCL2*- (blauer Balken) und *MCL1*-Genexpression (pinker Balken) von BMSC in Monolayer, die mit einem miR-29b-Mimic transfiziert wurden, im Vergleich zu BMSC, die mit einer *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) transfiziert wurden (0-Linie, n=6); (C) miR-29b- (gelber Balken), *BCL2*- (blauer Balken) und *MCL1*-Genexpression (pinker Balken) von BMSC, die in Monolayer mit einem miR-29b-Inhibitor transfiziert und anschließend als Micromass Pellets für 7 Tage in KM kultiviert wurden im Vergleich zu BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert und in KM kultiviert wurden (0-Linie, n=8); *= $p < 0,05$; **= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

BMSC, die in KM kultiviert wurden, wiesen im Vergleich zu BMSC in NM eine höhere Menge an BrdU auf, welches während der DNA-Synthese statt Thymidin eingebaut wurde, was auf eine höhere Proliferationsrate von BMSC in KM schließen lässt (Abb. 39A). Die Überexpression von miR-29b durch Transfektion mit einem miR-29b-Mimic führte jedoch zu keinem signifikanten Unterschied in den eingebauten Mengen an BrdU verglichen mit NT-miR-transfizierten BMSC (Abb. 39B).

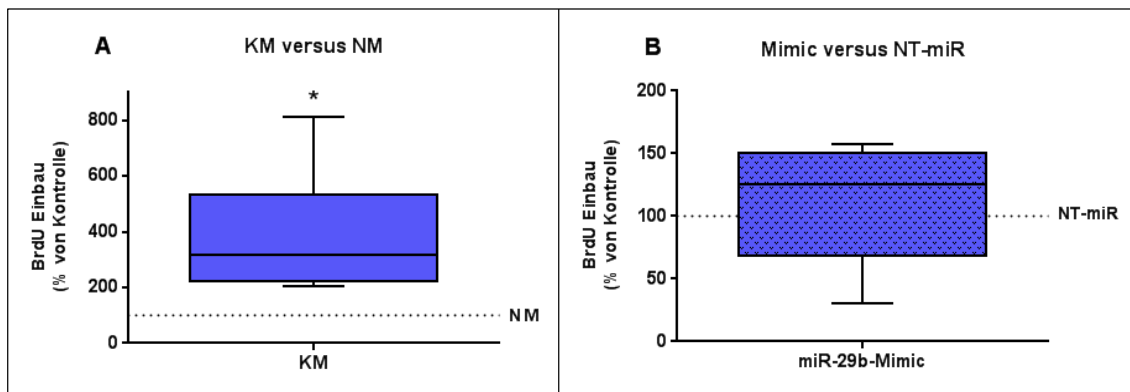


Abb. 39 Quantifizierung des BrdU-Einbaus während der DNA-Synthese

(A) Proliferation von BMSC in Monolayer, die in konditioniertem chondrogenen Medium kultiviert wurden (KM) im Vergleich zu BMSC, die in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert wurden (Linie bei 100 %, n=6); (B) Proliferation von BMSC, die mit einem miR-29b-Mimic transfiziert wurden, im Vergleich zu BMSC, die mit einer *non-targeting* Kontroll-miR (NT-miR) transfiziert wurden (Linie bei 100 %, n=8); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Linie bei 100 %; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

4.5.4 Stimulation mit IFN- γ induziert die miR-29b-Expression

Da lösliche, vom OA-Knorpelimplantat ins Medium abgegebene Faktoren für die Induktion der miR-29b-Expression verantwortlich sind, wurde zunächst untersucht, ob sich die Stimulation der miR-29b-Expression dadurch verhindern lässt, dass die Aktivität von Proteasen im konditionierten Medium durch Zugabe von Proteaseinhibitoren gehemmt wird. Neben Serin- und Cysteinproteasen, inhibierte der verwendete Proteaseinhibitorcocktail mit EDTA auch Matrixmetalloproteasen (MMPs). Weder durch Zugabe des Proteaseinhibitorcocktails mit EDTA zum KM (Abb. 40A) noch durch den EDTA-freien Proteaseinhibitorcocktail (Abb. 40B) ließ sich die durch Kultivierung in KM induzierte Hochregulation der miR-29b-Expression und die damit einhergehende Reduktion der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression im Vergleich zu BMSC in NM verhindern.

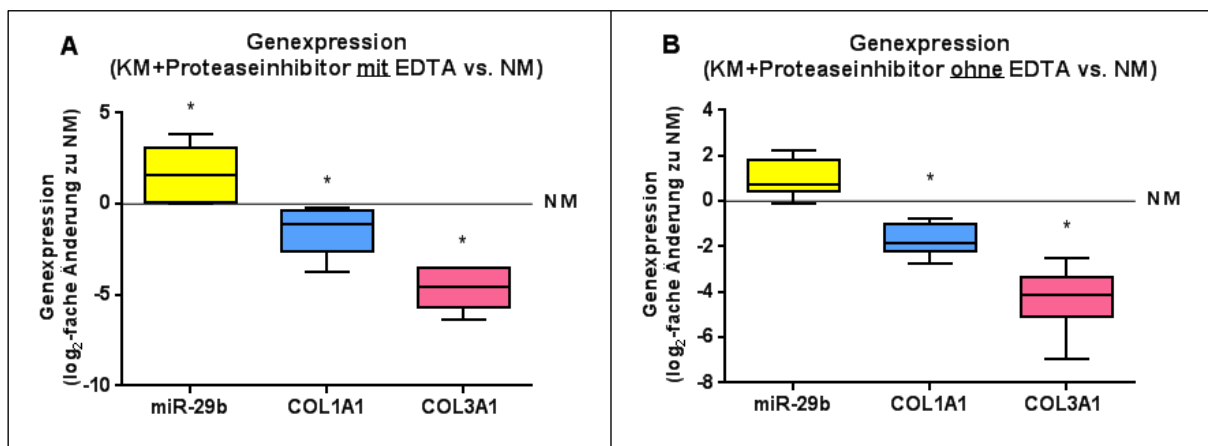


Abb. 40 Genexpression von BMSC, die in konditioniertem Medium versetzt mit Proteaseinhibitoren kultiviert wurden

miR-29b- (gelbe Balken), *COL1A1*- (blaue Balken) und *COL3A1*-Genexpression (pinke Balken) von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tage in konditioniertem chondrogenen Medium kultiviert wurden (KM), das mit einem Proteaseinhibitorcocktail mit EDTA (**A**) bzw. ohne EDTA (**B**) versetzt wurde, im Vergleich zu BMSC, die als Micromass Pellets in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert wurden (0-Linie, n=7); *= $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

Als nächstes wurde versucht, die miR-29b-Expression durch Zugabe verschiedener Zytokine zu stimulieren, von denen z.B. bekannt ist, dass sie einen inhibitorischen Effekt auf die Kollagenexpression haben oder die miR-29b-Expression in anderen Zelltypen fördern.

Der Zellkulturüberstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten enthielt mehr IL-8 als der von BMSC in Monokultur (Abb. 21, S. 77). Stimulation von BMSC mit IL-8 (10 ng/ml) hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von miR-29b, *COL1A1* oder *COL3A1* (Abb. 41A). Auch die Stimulation mit TNF- α (10 ng/ml) und IL-6 (0,5 - 10 ng/ml), welche im Überstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nachgewiesen wurden (Abb. 20, S. 75), konnte die miR-29b-Expression nicht induzieren (Abb. 41B, C). BMSC, die für 7 Tage als Micromass Pellets in chondrogenem Medium mit LIF (1, 5, 10 ng/ml) stimuliert wurden, zeigten keine Änderung in der miR-29b-, *COL1A1*- oder *COL3A1*-Genexpression im Vergleich zu unstimulierten BMSC (Abb. 41D). Stimulation mit IL-1 β (0,5 - 10 ng/ml), einem pro-inflammatorischen Zytokin, welches im Überstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten vorkam (Abb. 20, S. 75), hatte keinen Einfluss auf die miR-29b-Level (Abb. 41E), führte jedoch zu niedrigeren *COL1A1*- und höheren *COL3A1*-Genexpressionslevel im Vergleich zu unstimulierten BMSC. In BMSC hatte die Stimulation mit zwei verschiedenen Zytokinmischungen (IL-1 β +IL6, IL-1 β +IL-8+TNF- α) ebenfalls keinen Effekt auf die miR-29b-Expression (Abb. 41F). Stimulation von BMSC mit ansteigenden Konzentrationen von IFN- γ führte zu einem Anstieg der miR-29b-Expression und einer zunehmenden Reduktion der *COL1A1*- und *COL3A1*-Genexpression verglichen mit unstimulierten BMSC (Abb. 41G).

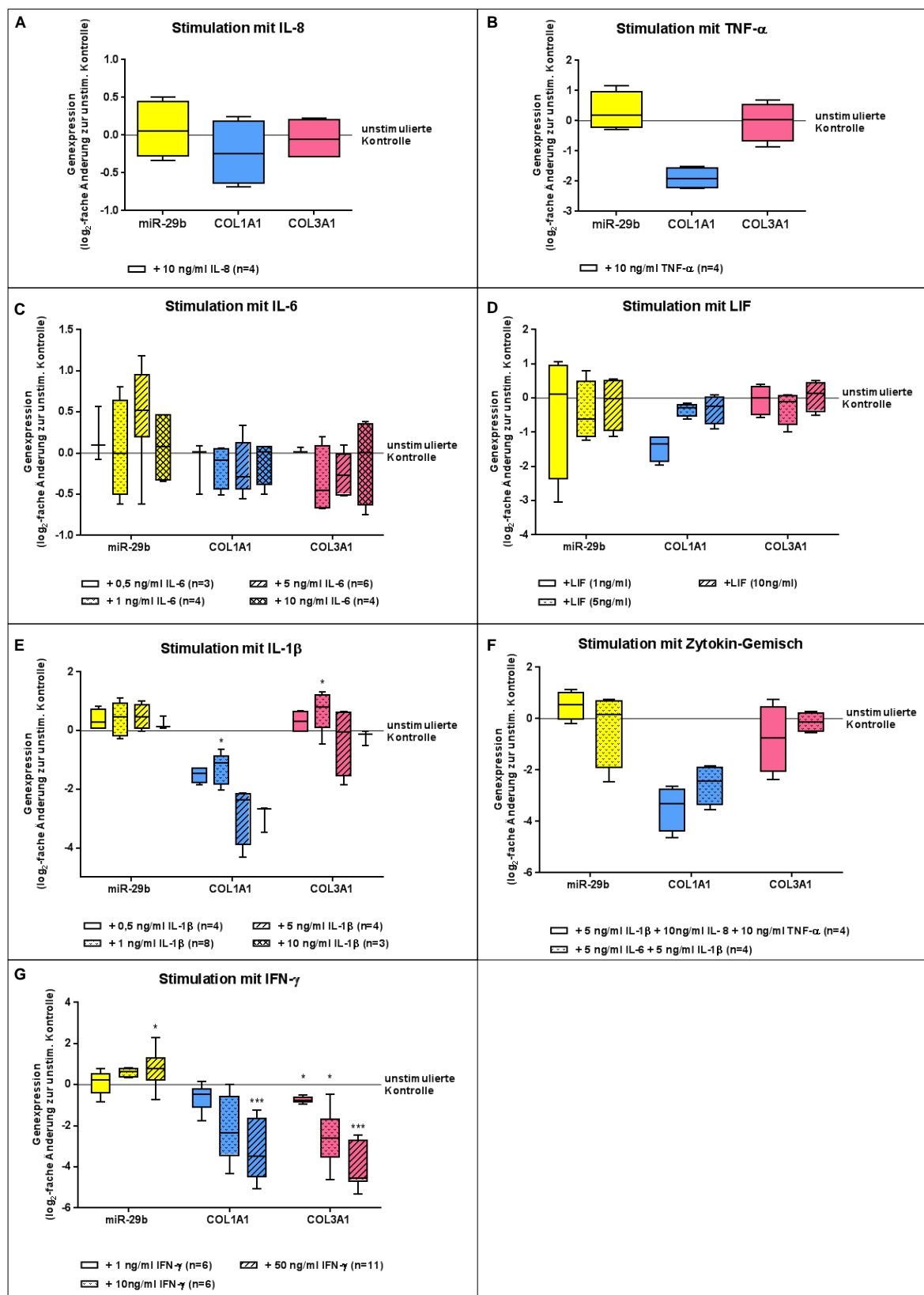


Abb. 41 Genexpression von BMSC nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen
 miR-29b- (gelbe Balken), COL1A1- (blaue Balken) und COL3A1-Genexpression (pinke Balken) von BMSC, die als Micromass Pellets für 7 Tage in chondrogenem Medium mit verschiedenen Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen (Balken mit Mustern) stimuliert wurden im Vergleich zu BMSC, die als Micromass Pellets in nicht-konditioniertem Medium (NM) kultiviert wurden (0-Linie); *= $p < 0,05$; ***= $p < 0,001$; signifikanter Unterschied zur 0-Linie; nicht-parametrischer Wilcoxon Signed-Rank Test.

5 Diskussion

Um zukünftig MSC-basierte Therapieansätze für die Knorpelregeneration bei OA einzusetzen, wie beispielsweise zurzeit bereits Chondrozyten bei der ACT zur Therapie kleiner Knorpeldefekte, ist ein besseres Verständnis des modulatorischen Einflusses der OA-Mikroumgebung wichtig, in welche die Zellen implantiert werden. Denn zum einen kann der artikuläre Knorpel und der subchondrale Knochen die Chondrogenese der MSC bzw. den Phänotyp der differenzierten Chondrozyten beeinflussen, zum anderen können die implantierten Zellen wiederum einen Einfluss auf den geschädigten Knorpel/Knochen und das intrinsische Knorpelregenerationspotential haben. In dieser Arbeit wurde deshalb die Interaktion zwischen artikulärem Knorpel- und subchondralem Knochenexplantat mit differenzierten Chondrozyten und chondrogen differenzierenden BMSC mittels direkter und indirekter *in vitro* 3D-Kokulturmodelle untersucht.

5.1 Einfluss von BMSC/Chondrozyten auf das kokultivierte Knorpelimplantat

Kokultivierte BMSC/Chondrozyten könnten z.B. durch die Sekretion löslicher Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine einen Einfluss auf die Genexpression und Proteinbiosynthese der Chondrozyten oder auf deren Proliferation im OA-Knorpelimplantat haben. Die kokultivierten Zellen können auch in das OA-Knorpelimplantat einwandern und dort neue Matrixkomponenten produzieren. MSC sind neben ihren trophischen Eigenschaften auch für ihre parakrinen, anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte bekannt und könnten somit einen therapeutischen Nutzen für die intrinsische Knorpelregeneration haben (Murphy *et al.*, 2013).

Um den möglichen Einfluss kokultivierter Zellen auf das Knorpelimplantat zu untersuchen, wurde mittels SDS-PAGE/2D-Elektrophorese nach Unterschieden im Proteinexpressionsmuster zwischen OA- und N-Knorpelimplantaten gesucht, die zellfrei bzw. mit BMSC/Chondrozyten kultiviert wurden. Für die Herstellung von Proteinextrakten aus den Knorpelimplantaten wurde eine Kombination aus physikalischen, enzymatischen und chemischen Methoden verwendet, die von Wilson *et al.* für Hüftkopf-Knorpel von Mäusen etabliert wurde (Wilson und Bateman, 2008; Wilson *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2012). Zunächst wurde das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Knorpelimplantat mit einem Dismembrator pulverisiert

und die GAGs anschließend mittels Chondroitinase deglykosyliert. Die Proteine wurden schließlich mit zwei verschiedenen Puffern extrahiert: zuerst mit einem nicht-denaturierenden NaCl-Puffer, gefolgt von einem chaotropen GdnHCl-Puffer. Mit NaCl werden v.a. intrazelluläre Proteine extrahiert (Vincourt *et al.*, 2006), mit GdnHCl, das Bindungen zwischen Matrixkomponenten löst, v.a. Matrixproteine (Belluoccio *et al.*, 2006).

Adulter humaner artikulärer Knorpel besteht hauptsächlich aus einer dichten ECM, die sich aus hochmolekularen Molekülen wie Kollagenen und Proteoglykanen zusammensetzt und in die sehr wenige Chondrozyten eingebettet sind (ca. 1-2 % des Knorpelvolumens). Deswegen ist es schwer, zelluläre, niedermolekulare Chondrozyten-Proteine im Proteinextrakt aus Knorpelimplantaten zu detektieren, der hauptsächlich ein Gemisch aus hochmolekularen ECM-Proteinen enthält. Deshalb wurde zunächst versucht, das erhaltene Knorpelproteinlysate vor der SDS-PAGE weiterzufractionieren in Proteine, die größer bzw. kleiner als 100 kDa sind. Jedoch war die Ausbeute an Proteinen < 100 kDa aus einem Knorpelimplantat für die Auftrennung im SDS-Gel mit anschließender Coomassie- oder Silberfärbung zu gering, um detektiert zu werden. In den Gesamtproteinextrakten konnten keine eindeutigen Unterschiede im Proteinbandenmuster zwischen den verschiedenen Kokulturbedingungen (zellfrei vs. Kokultur mit BMSC/Chondrozyten) oder zwischen unterschiedlich langer Kulturdauer (Tag 7 vs. Tag 28) detektiert werden. Auch das Bandenmuster der Proteinextrakte von OA- und N-Knorpelimplantaten wies, anders als erwartet, keine offensichtlichen Unterschiede auf. Deshalb wird vermutet, dass durch die sequentielle Proteinextraktion keine quantitativen Unterschiede mehr detektierbar waren, da es bei jedem Schritt zu Verlusten kam.

Die erhaltenen Proteinmengen schwankten trotz gleichem Ausgangsgewicht der Knorpelimplantate erheblich und auch in der GdnHCl-löslichen Proteinfraktion tauchten Banden auf, die bereits in den NaCl-löslichen Proteinextrakten vorkamen. Dies deutet darauf hin, dass die Extraktion mit NaCl unterschiedlich effektiv funktioniert hat.

Da die Auftrennung nach dem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE scheinbar nicht ausreichend war, um feine Unterschiede zwischen OA-/N-Knorpelproteinextrakten in Mono- oder Kokultur mit BMSC/Chondrozyten zu detektieren, wurden die Proteinextrakte auch mittels 2D-Elektrophorese analysiert. Bei der 2D-Elektrophorese werden Proteine zuerst bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach

ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradienten und anschließend nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE) getrennt. Dies führt zu einer besonders hochauflösenden Trennung von Proteingemischen in einzelne Proteinspots, die anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden können. Dadurch treten möglicherweise Unterschiede in niedermolekularen Proteinen hervor, die im 1D-Gel nicht sichtbar sind. Allerdings eignet sich die 2D-Elektrophorese nur für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 100 kDa. Somit stören nicht nur die negativ geladenen, anionischen Knorpelkomponenten wie Aggrecan und Hyaluronsäure bei der IEF, sondern auch alle anderen hochmolekularen Knorpelproteine, wodurch die selteneren zellulären Chondrozytenproteine überdeckt werden und nicht detektiert werden können. Das Abfiltrieren der Proteine > 100 kDa führte, wie oben bereits erwähnt, zu einer zu geringen Proteinausbeute. Auch eine zusätzliche Deglykosylierung der Proteinextrakte vor der IEF mit einer Proteindeglykosylierungsmischung aus fünf verschiedenen Proteindeglycosidasen (Promega) brachte keine Verbesserung und die Knorpelproteinextrakte ließen sich nicht mittels 2D-Elektrophorese trennen.

Es konnte somit nicht geklärt werden, ob die kokultivierten Zellen möglicherweise einen Einfluss auf das Knorpelimplantat haben. Hierzu wären weitere, detailliertere Untersuchungen der komplexen Proteinextrakte aus Knorpelimplantaten nötig, wie z.B. eine differentielle quantitative Analyse der Peptide mittels ICAT (*i*sotope-*c*oded *a*ffinity *t*ag, Isotopen-codierte Affinitätsmarkierung) oder iTRAQ (*i*sobaric *t*ags for *r*elative and *a*bsolute *q*uantitation), beides nicht Gel-basierte Methoden. Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss kokultivierter Zellen auf das Knorpelimplantat zu analysieren wäre beispielsweise mittels eines cDNA-Arrays. Hierfür muss allerdings möglichst reine mRNA von hoher Qualität aus dem Gewebe isoliert werden. Dies ist bei adultem, artikulärem Knorpel aufgrund der geringen Dichte an Chondrozyten problematisch. Damit würde man einen Einfluss auf die Genexpression der Chondrozyten im Knorpelimplantat detektieren, was sich jedoch nicht unbedingt auf Proteinebene widerspiegeln muss.

5.2 Gegenseitige Beeinflussung der Proteinsekretion von artikulärem Knorpelimplantat und BMSC bei Kokultur

Da Zellen durch die Sekretion von verschiedenen Faktoren ihre Mikroumgebung beeinflussen, könnten von N-Knorpelimplantaten abgegebene Faktoren beispielsweise eine fördernde Wirkung und solche von OA-Knorpelimplantaten einen hemmenden Einfluss auf chondrogen differenzierende BMSC haben. Andererseits könnten wie schon erwähnt auch die kokultivierten Zellen einen modulierenden Effekt auf die Knorpelhomöostase haben. Deshalb wurde der gegenseitige Einfluss auf die Proteinsekretion von Knorpelimplantaten und chondrogen differenzierenden BMSC in Kokultur analysiert. Mittels eines Multiplex-Immunoassays wurde nach unterschiedlich sezernierten Faktoren wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Zellkulturüberstand von BMSC, OA- und N-Knorpelimplantat in Monokultur bzw. Kokultur gesucht.

Zytokine spielen in der Pathogenese der OA eine zentrale Rolle (Fernandes *et al.*, 2002; Wojdasiewicz *et al.*, 2014), u.a. indem sie das Gleichgewicht von Proteinasen wie z.B. MMPs und deren Inhibitoren, den TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) regulieren. Bei OA ist das Gleichgewicht von Synthese und Abbau der ECM zu Gunsten des Katabolismus verschoben (Goldring, 2000). Die Kollagen- und Proteoglykandegradation kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 β , TNF- α , IL-17 und IL-18 wirken katabol, anti-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, IL-1ra (*interleukin-1 receptor antagonist*) und IFN- γ werden als inhibitorische Faktoren eingestuft, da sie die Wirkung kataboler Zytokine blockieren. Mitglieder der TGF- β -, BMP- und FGF-Familie sowie IGF-1 gelten als anabole Knorpelfaktoren, da sie die Synthese von Matrixproteinen fördern. Außerdem gibt es noch sog. regulatorische Zytokine wie IL-6, IL-8 und LIF, die nicht direkt den Knorpelabbau stimulieren, sondern die Effekte kataboler Zytokine modulieren (Goldring, 2000).

Der Zellkulturüberstand von chondrogen differenzierenden BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelimplantaten enthielt am Entnahmezeitpunkt Tag 7 mehr IL-6 als der von BMSC in Monokultur, für Tag 28 wurde kein Unterschied mehr beschrieben (Leyh *et al.*, 2014b). Die Luminex-Analyse von Zellkulturüberständen nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung bestätigte, dass zu einem späteren Zeitpunkt der Chondrogenese keine Unterschiede bezüglich der IL-6-Sekretion zwischen BMSC in

Mono- und Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten bestanden. Sowohl BMSC als auch OA- und N-Knorpelexplantate sezernierten IL-6 allerdings auch noch nach 28 Tagen in Kultur, wobei sich ein tendenzieller Unterschied zwischen der Sekretion von OA- und N-Knorpelexplantaten andeutete. Ob N-Knorpelexplantate jedoch tatsächlich mehr IL-6 sezernieren als OA-Knorpelexplantate müsste in einer größeren Stichprobe von Überständen analysiert werden, denn Leyh *et al.* (2014b) konnten IL-6 in einer kleinen Stichprobe (n=5) nur an Tag 7 in Überständen von N-, nicht jedoch von OA-Knorpelexplantaten detektieren. Da nach 28 Tagen keine Unterschiede bezüglich der IL-6-Sekretion zwischen BMSC in Mono- oder Kokultur mit OA- oder N-Knorpelexplantaten detektiert wurden, scheint vom Knorpelexplantat sezerniertes IL-6 zumindest keinen dauerhaften Einfluss auf die chondrogene Differenzierung kokultivierter BMSC zu haben. Dafür spricht auch, dass die Stimulation von chondrogen differenzierenden BMSC mit IL-6 nach 7 Tagen die Genexpression von *COL2A1* zwar reduzierte, nach 28 Tagen jedoch kein Unterschied mehr zu den unstimulierten Kontrollen beschrieben wurden (Leyh *et al.*, 2014b).

Von IL-1 β ist im Zusammenhang mit OA bekannt, dass es katabole Prozesse im Knorpel z.B. durch die Induktion von MMPs fördert, wodurch es zur verstärkten Matrixdegradation im Verlauf der OA kommt (Wojdasiewicz *et al.*, 2014). IL-1 β wurde in der Luminex-Analyse allerdings nur in einem aus drei Zellkulturüberständen von OA-Knorpelexplantaten detektiert und war in solchen von N-Knorpelexplantaten nicht nachweisbar. BMSC in Mono- und Kokultur mit Knorpelexplantaten sezernierten IL-1 β hingegen in detektierbaren Mengen, wobei die IL-1 β -Level von BMSC in Monokultur höher waren als in Kokultur mit Knorpelexplantaten. Leyh *et al.* wiesen an Tag 28 im Zellkulturüberstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten in einer größeren Stichprobe (n=6) jedoch signifikant mehr IL-1 β nach als bei BMSC in Monokultur. Es wurde allerdings kein Unterschied zwischen der Sekretion von OA- und N-Knorpelexplantaten detektiert (Leyh *et al.*, 2014b). Die Ergebnisse der Luminex-Analyse deuten darauf hin, dass Kokultur mit Knorpelexplantaten die IL-1 β -Sekretion der BMSC inhibierte, die Ergebnisse von Leyh *et al.* (2014b) legen nahe, dass OA-Knorpelexplantate die IL-1 β -Sekretion von BMSC eher steigerte. Um zu klären, ob Kokultur mit Knorpelexplantaten die IL-1 β -Sekretion von BMSC fördert oder hemmt, sind weitere Analysen nötig. Jedenfalls beeinflusst die Kokultur mit Knorpelexplantaten die Proteinsekretion von BMSC und IL-1 β hemmt deren chondrogene Differenzierung, denn Stimulation von chondrogen differenzierenden

BMSC mit IL-1 β reduzierte u.a. die Genexpression von *COL2A1* im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Leyh *et al.*, 2014b).

TNF- α wirkt wie IL-1 β ebenfalls katabol durch die Induktion von MMPs und die Inhibition von TIMPs (Sakai *et al.*, 2001; Shingu *et al.*, 1993). Im Zellkulturüberstand von BMSC und Knorpelimplantaten jeweils in Mono- und gegenseitiger Kokultur konnte TNF- α detektiert werden. Obwohl auch die mit zellfreien Fibringelen kultivierten Knorpelimplantate TNF- α sezernierten und der Überstand von BMSC in Monokultur die höchste TNF- α -Konzentration aufwies, führte die Kokultur nicht zu einem additiven Effekt. Die TNF- α -Level der Kokulturen waren geringer als die von BMSC in Monokultur und nur geringfügig höher als die der Knorpelimplantate in Monokultur. Somit scheint die Kokultur mit Knorpelimplantaten die TNF- α -Sekretion von BMSC zu inhibieren. Außerdem beeinflussten artikuläre Knorpelimplantate die TNF- α -Sekretion von BMSC unabhängig davon, ob die chondrogene Differenzierung in einer OA-Mikroumgebung oder in Gegenwart von normalem Knorpel stattfand.

IL-8 konnte sowohl in Zellkulturüberständen nach 7 und 28 Tagen von OA- sowie N-Knorpelimplantaten und BMSC in Monokultur als auch in solchen von BMSC in Kokultur mit OA- und N-Knorpelimplantaten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen die von Leyh *et al.* (2014b). Es konnte gezeigt werden, dass die sezernierte Menge an IL-8 in allen Kulturbedingungen über die Zeit signifikant zurückging. An Tag 7 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, an Tag 28 jedoch war die IL-8-Konzentration in den Überständen von N- und OA-Knorpelimplantaten mit zellfreien Fibringelen sowie in Kokultur mit BMSC höher als im Überstand der BMSC-Monokultur. Die Kokultur mit BMSC reduzierte die IL-8-Sekretion der Knorpelimplantate deutlich, bei den OA-Knorpelimplantaten sogar signifikant. Somit hemmen BMSC die IL-8-Sekretion des Knorpels, was einen anabolen Effekt auf den Knorpelmetabolismus darstellt und sich somit positiv auf die Knorpelhomöostase auswirken könnte.

An der physiologischen Knorpelhomöostase sind Proteinasen wie Aggrecanasen (ADAMTS4, ADAMTS5), Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13) und Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) sowie deren Regulatoren, die TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) beteiligt. Bei der Pathogenese der OA spielen Proteinasen und ihre Inhibitoren eine zentrale Rolle (Burrage *et al.*, 2006; Galasso *et al.*, 2012). OA ist durch die Degradation des artikulären Knorpels gekennzeichnet, die durch gesteigerte MMP-Aktivität und/oder deren mangelnder Inhibition durch TIMPs begünstigt wird. MMPs sind Zink-

abhängige Endopeptidasen, wobei Kollagenasen (MMP-13) die Triplehelix spalten und Gelatinasen (MMP-2) anschließend das denaturierte Kollagen in kleine Fragmente spalten. Im Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der OA wurde v.a. die Expression von MMP-13 intensiv untersucht, da dieses Kollagen II-spaltende Enzym von OA-Chondrozyten vermehrt exprimiert wird und dessen Expression durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α gesteigert wird (Forsyth *et al.*, 2005; Shlopov *et al.*, 1997). MMP-2 (Gelatinase A) ist u.a. in der Lage folgende ECM-Komponenten abzubauen: Kollagen I, IV, V, VII und X, Laminin, Elastin, Fibronectin und Proteoglykane. MMP-9 (Gelatinase B), neben Cathepsin K die häufigste Osteoklasten-Protease, spaltet Kollagen IV, V, VII und X, Elastin und Kollagen I, II und III nach Proteolyse durch Kollagenasen (Galasso *et al.*, 2012). Chondrozyten exprimieren sowohl MMP-2 als auch MMP-9 und im OA-Knorpel ist die Expression dieser beiden MMPs erhöht (Duerr *et al.*, 2004; Soder *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der Luminex-Analyse deuteten darauf hin, dass die Knorpel-explantate einen inhibitorischen Effekt auf die MMP-9-Sekretion kokultivierter chondrogen differenzierender BMSC haben. Dies könnte die Bildung einer Knorpel-matrix fördern. Deshalb wurden zur Verifizierung mit Zellkulturüberständen von BMSC, OA- und N-Knorpelexplantaten in Mono- und Kokultur Gelatine-Zymogramme erstellt. Im Zymogramm konnten jedoch nur die Banden der Pro- und aktiven Form von MMP-2 detektiert werden. MMP-9 wird von OA-Knorpel in viel geringeren Mengen sezerniert als MMP-2 (Soder *et al.*, 2006) und ließ sich vermutlich deshalb nicht mittels Gelatine-Zymographie nachweisen. OA- und N-Knorpelexplantate sezernierten vergleichbare Mengen an pro-MMP-2. Auch bei der reifen Form des Enzyms gab es keinen Unterschied zwischen OA- und N-Knorpelexplantaten. Im Vergleich zu BMSC in Monokultur sezernierten OA- und N-Knorpelexplantate in Monokultur weniger pro-MMP-2, bei der aktiven Form gab es keine signifikanten Unterschiede. In kokultivierten BMSC mit Knorpelexplantaten summierte sich die pro-MMP-2-Menge auf und war somit jeweils signifikant höher als bei monokultivierten Zellen oder zellfreien Explantaten. Für die reife Form war nur der Unterschied zwischen Kokultur und den Knorpelexplantat-Monokulturen signifikant, nicht jedoch zur BMSC-Monokultur. Da bei der Knorpeldegradation jedoch die aktive Form eine Rolle spielt und die Sekretion von MMP-2 von BMSC in Mono- und Kokultur mit Knorpelexplantaten sich nicht signifikant unterschied, scheinen die Knorpelexplantate keinen Einfluss auf chondrogen differenzierende BMSC bezüglich der MMP-2-

Aktivität zu haben. Andererseits bringen die kokultivierten BMSC möglicherweise einen negativen, katabolen Effekt für den Knorpel mit sich, da unter Kokulturbedingungen sowohl mehr Pro-MMP-2 als auch mehr von der aktiven Form im Überstand vorhanden war als im Zellkulturüberstand zellfreier Knorpelimplantate. Somit könnte das von den BMSC zusätzlich sezernierte MMP-2 den Knorpelabbau verstärken. Um diese Hypothese zu überprüfen sind allerdings weitere Analysen wie z.B. zur Expression der TIMPs nötig, denn neben der Hemmung von aktiven MMPs sind TIMPs auch an der Aktivierung der Pro-Form beteiligt. So interagieren beispielsweise TIMP-2 und -4 mit Pro-MMP-2 und TIMP-1 mit Pro-MMP-9 (Brew und Nagase, 2010). Außerdem ist bekannt, dass BMSC auch TIMPs sezernieren und auf pro-inflammatorische Zytokine mit gesteigerter TIMP-Expression reagieren (Lozito und Tuan, 2011). Dies könnte bei Kokultur möglicherweise auch einen positiven, protektiven Effekt auf die Knorpel-ECM haben.

Durch die Interaktion zwischen artikulärem Knorpelimplantat und chondrogen differenzierenden BMSC kommt es zu veränderter Proteinsekretion sowohl des Knorpelimplantats als auch der BMSC. Durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener kataboler und anaboler Faktoren ist es schwer, eindeutig positive oder negative Effekte für die Zellen oder das Gewebeimplantat durch die gegenseitige Beeinflussung der Proteinsekretion auszumachen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass es durchaus Unterschiede in der Proteinsekretion zwischen Mono- und Kokultur gibt, die für eine BMSC-basierte Knorpelregeneration bei OA von Bedeutung sein könnten.

5.3 Subchondrale Knochen- und artikuläre Knorpelimplantate beeinflussen die Expression von miRs und potentiellen Zielgenen in kokultivierten BMSC und Chondrozyten

Die direkte Kokultur von BMSC/Chondrozyten mit OA-Knorpel- und OA-Knochenimplantaten führt zu einer veränderten Zusammensetzung der von den Zellen in Fibringelen neugebildeten ECM mit verminderten mechanischen und biochemischen Eigenschaften im Vergleich zur Monokultur (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b). Da Kokultur mit OA-Gewebeimplantaten vor allem die Expression von Kollagenen wie Kollagen I, II und III reduziert (Leyh *et al.*, 2014a; Leyh *et al.*, 2014b), war ein Ziel dieser Arbeit die Identifizierung der verantwortlichen regulatorischen Faktoren. Als mögliche Modulatoren der Kollagenexpression kommen miRs in Betracht. miRs

können die Genexpression post-transkriptionell regulieren, indem sie entweder die Translation inhibieren oder den Abbau der Ziel-mRNA fördern. Ersteres führt zu reduzierter Proteinsynthese, letzteres zusätzlich zu reduzierten mRNA-Leveln. Deshalb wurde zunächst geprüft, ob OA-Knorpel-/subchondrale OA-Knochen-explantate die Expression bestimmter miRs in BMSC und Chondrozyten beeinflussten, die mit solchen Genen assoziiert sind, deren Expression durch Kontakt zu OA-Gewebeexplantaten verändert ist. Sowohl von OA- als auch normalen Chondrozyten sezernierte Morphogene können die chondrogene Differenzierung von MSC induzieren, ohne die hypertrophe Differenzierung zu fördern (Aung *et al.*, 2011; Diao *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2007). Deshalb wurden BMSC und Chondrozyten zusätzlich gemeinsam in einem Fibringel gemischt und dieses Zellgemisch mit Gewebeexplantaten kultiviert (Trikultur). Neben löslichen Faktoren scheinen auch Zell-Zell-Interaktionen wichtig zu sein. Bei der direkten Kokultur von MSC und Chondrozyten in Form von Pelletaggregaten profitieren durch trophische MSC-Faktoren auch die Chondrozyten, die nicht dedifferenzieren sondern ihren chondrogenen Phänotyp beibehalten und sogar proliferieren (Acharya *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2013).

Die Expression von Kollagen II, dem dominierenden Kollagen der Knorpel-ECM, kann entweder direkt durch den Transkriptionsfaktor Sox9 gesteuert werden (Bell *et al.*, 1997) oder indirekt über miR-675. Dudek *et al.* (2010) postulierten, dass die Expression von Kollagen II in humanen artikulären Chondrozyten durch miR-675 reguliert wird, indem die miR einen bisher nicht charakterisierten Repressor der Kollagen-II-Expression inhibiert. Die Expression der miR-675 wiederum ist vom Transkriptionsfaktor Sox9 abhängig, der die Expression von H19 reguliert, aus dem die reife miR-675 hervorgeht (Abb. 42).

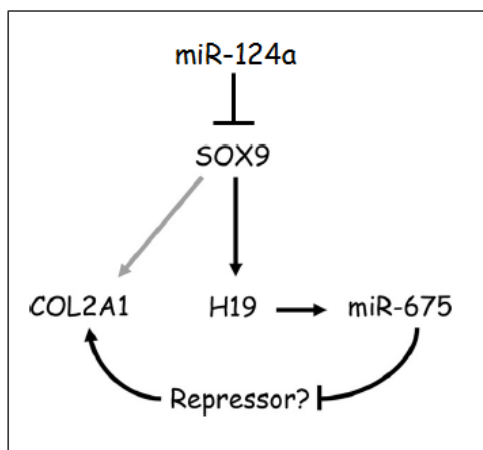


Abb. 42 Regulation der COL2A1-Expression

Die COL2A1-Expression kann direkt durch SOX9 verstärkt werden (grauer Pfeil) oder indirekt, indem SOX9 die Expression der lncRNA H19 fördert, aus der die reife miR-675 hervorgeht, die einen noch unbekannten Repressor von COL2A1 inhibiert. Die Expression von SOX9 kann von der miR-124a inhibiert werden.

(Abbildung modifiziert nach Dudek *et al.*, 2010)

Die Kokultur mit OA/N-Gewebeexplantaten führte allgemein zu erhöhter miR-675-Expression in kokultivierten Chondrozyten, BMSC und dem Gemisch, wohingegen die *COL2A1*-Genexpression im Vergleich zu den jeweiligen Monokulturen inhibiert wurde.

miR-675 wurde als Knorpel-spezifischer, SOX9-abhängiger positiver Regulator von *COL2A1* beschrieben (Dudek *et al.*, 2010). Deshalb erwartet man bei einem erhöhten miR-675-Level auch einen erhöhten *COL2A1*-Level, denn der Repressor der *COL2A1*-Expression sollte dann verstärkt von der miR inhibiert werden. Dadurch sollte die Transkription von *COL2A1* weniger reprimiert werden. Da die Kokultur mit Gewebeexplantaten zwar die miR-675-Expression stimulierte, aber zu reduzierter *COL2A1*-Expression von Chondrozyten und chondrogen differenzierenden BMSC führte, postulieren wir, dass die durch Kokultur mit Knochen- und Knorpel-explantaten reprimierte *COL2A1*-Expression nicht durch miR-675 reguliert ist.

Sowohl die Kokultur mit OA- als auch mit N-Knorpel-explantaten resultierte in chondrogen differenzierenden BMSC in geringerer *COL2A1*-Expression verglichen mit BMSC in Monokultur. Auch beim direkten Vergleich zwischen BMSC in Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten und BMSC in Kokultur mit N-Knorpel-explantaten ergaben sich keine Unterschiede in den miR-675- und *COL2A1*-Expressionslevel. Dass sich, anders als erwartet, keine deutlichen Unterschiede zwischen der Kollagen- und miR-Expression zwischen der Kokultur mit OA- und N-Knorpel-explantaten zeigten, deckt sich mit den Ergebnissen der Luminex-Analyse. Die Untersuchung der Zellkultur-überstände deckte nur marginale Unterschiede in der Sekretion zwischen OA- und N-Knorpel-explantaten auf. Dies könnte daran liegen, dass der normale Knorpel, bevor er mit BMSC kokultiviert wurde, schon ca. zwei Wochen in Medium gelagert war. Außerdem fand durch das Ausstanzen der Explantate ebenfalls eine Verletzung des N-Knorpels statt. Die Daten zur Kokultur von Chondrozyten, die aus N-Knorpel isoliert und mit N-Knorpel-explantaten kokultiviert wurden, sind wenig aussagekräftig, da die N-Knorpelproben nur in geringer Anzahl und Menge zur Verfügung standen. Doch es deutete sich an, dass auch das N-Knorpel-explantat eine negative Wirkung auf die *COL2A1*-Expression der kokultivierten N-Chondrozyten hatte. Allerdings war hierfür auch nicht die miR-675 verantwortlich, da deren Expression durch die Kokultur induziert wurde. Es lässt sich somit zusammenfassen, dass OA-Knochen- sowie OA- und N-Knorpel-explantate die *COL2A1*-Expression von kokultivierten Zellen reprimiert. Diese Inhibition der *COL2A1*-Expression wird jedoch nicht durch miR-675 vermittelt.

Der Vergleich der Expressionslevel an Tag 28 zu Tag 7 zeigte den Einfluss der Kulturdauer in chondrogenem Medium. Mit fortschreitender chondrogener Differenzierung exprimierten BMSC in Mono- sowie in Kokultur mit OA- und N-Knorpel-explantaten mehr *COL2A1*, d.h. dass BMSC auch in Gegenwart von Gewebe-explantaten die chondrogene Differenzierungslinie einschlagen können. Dies trifft möglicherweise auch auf die Kokultur mit OA-Knochen zu, auch wenn die Erhöhung der *COL2A1*-Expression hier nicht signifikant war. Auf Chondrozyten und das Gemisch hatte die Kulturdauer in chondrogenem Medium kaum einen Einfluss bezüglich der *COL2A1*-Expression. Reife Chondrozyten, die nicht dedifferenzieren sondern ihren Phänotyp beibehalten, exprimieren gleichbleibende Mengen an *COL2A1*.

Da miR-675 als regulatorischer Faktor der *COL2A1*-Expression in unserem System ausgeschlossen werden konnte, wurde nach einer weiteren miR gesucht, die die Expression von *COL2A1* regulieren kann. Die Literaturrecherche ergab, dass miR-301 im 3'-UTR der *COL2A1*-mRNA binden kann. Dies wurde auch mittels Luciferase-Assay in Brustkrebszelllinien bereits nachgewiesen (Shi *et al.*, 2011). Doch die Kokultur von BMSC mit OA-Knorpel-explantaten hatte keinen Einfluss auf die Expression von miR-301.

Wie schon erwähnt, wird die Expression von *COL2A1* vor allem direkt vom Transkriptionsfaktor Sox9 gesteuert (Bell *et al.*, 1997). Somit erwartet man bei reduziertem *COL2A1*-Level durch Kokultur mit Gewebeexplantaten auch eine erniedrigte Expression von SOX9. Deshalb wurde der Einfluss der Gewebe-explantate auf die Expression von SOX9 in kokultivierten Zellen untersucht. Außerdem wurden auch die Expressionslevel von miR-124a analysiert, denn es wurde mittels Luciferase-Assay mit HeLa-Zellen bestätigt, dass SOX9 ein Zielgen dieser miR ist (Cheng *et al.*, 2009). Somit könnte die in Kokultur beobachtete Inhibition der *COL2A1*-Expression durch eine gesteigerte miR-124a-Expression hervorgerufen werden, die die SOX9-Expression inhibiert.

Weder die Kokultur mit OA-Knochen- noch mit OA-Knorpel-explantaten führte in BMSC, Chondrozyten oder dem Gemisch beider Zelltypen zu einer Veränderung der SOX9-Expression im Vergleich zu monokultivierten Zellen. Lediglich bei der Kokultur von BMSC mit N-Knorpel-explantaten war die SOX9-Expression nach 28 Tagen tendenziell erhöht. Die SOX9-Expressionslevel von Tag 7 und Tag 28 unterschieden sich in allen Ko- und Monokulturbedingungen nicht signifikant voneinander, obwohl

monokultivierte BMSC im Verlauf der chondrogenen Differenzierung mehr *COL2A1* exprimierten. Jedoch hatten die Gewebeexplantate einen Einfluss auf die miR-124a-Expression. OA- und N-Knorpelexplantate förderten die miR-124a-Expression in allen kokultivierten Zellen, die Kokultur mit OA-Knochenexplantaten nur in Chondrozyten und dem Gemisch, nicht jedoch in BMSC. Da die Regulation durch miRs post-transkriptionell stattfindet, könnten sich die Auswirkungen der miR-mRNA-Interaktion auch ausschließlich auf Proteinebene zeigen. Deshalb wurden aus den Fibringelen Proteinlysate hergestellt und die Sox9-Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. OA-Knorpel beeinflusste die Sox9-Proteinexpression von Chondrozyten nicht, steigerte aber die Sox9-Proteinexpression von chondrogen differenzierenden BMSC um ca. 50%. Allerdings wurde nur die Gesamt-Sox9-Proteinmenge bestimmt. Da die phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors (pSox9) einen *COL2A1*-Enhancer aktiviert (Huang *et al.*, 2000), wären weitere Analysen zum Anteil an phosphoryliertem Sox9 in den Proteinlysaten nötig gewesen. Möglicherweise beeinträchtigt die Kokultur die Phosphorylierung von Sox9. Dies würde zu reduzierten *COL2A1*-Level führen, weil weniger aktives, phosphoryliertes Sox9 zur Verfügung steht, um die *COL2A1*-Expression zu verstärken. Dadurch ließe sich erklären, warum die erhöhten Sox9-Proteinlevel nicht wie erwartet die Expression von *COL2A1* erhöhen. Die Inhibition der *COL2A1*-Expression bei Kokultur mit Gewebeexplantaten wird somit wahrscheinlich durch andere Faktoren/andere miRs geregelt.

Die Kokultur mit Gewebeexplantaten steigerte die Expression von miR-124a. Die Suche nach weiteren potentiellen Zielgenen von miR-124a mittels miRWalk (Dweep und Gretz, 2015) lieferte unzählige Treffer. Von denen wurde CTGF als vielversprechender Kandidat identifiziert, da die miR-124/CTGF-Interaktion schon mittels eines Luciferase-Reporter-Assays in einer Brustkrebszelllinie bestätigt werden konnte (Lv *et al.*, 2011). BMSC und ein Gemisch aus BMSC und Chondrozyten wiesen nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung in Kokultur mit OA-Knochenexplantaten niedrigere *CTGF*-Level auf als die entsprechenden Monokulturen. Beim Gemisch führte auch die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten im Vergleich zur Kultur ohne Explantat zu erniedrigter *CTGF*-Expression. Im Verlauf der chondrogenen Differenzierung nahm bei BMSC in Mono- und Kokultur mit N-Knorpelexplantaten die *CTGF*-Expression zu. BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten exprimierten im

Vergleich zu BMSC in Kokultur mit N-Knorpelexplantaten weniger *CTGF*. Um zu überprüfen, ob sich die Inhibition der *CTGF*-Expression durch miR-124a möglicherweise auf Proteinebene deutlicher auswirkt, wurde die *CTGF*-Konzentration von Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Dabei bestätigte sich, dass BMSC mit zunehmender chondrogener Differenzierung mehr *CTGF* produzierten. Auch OA-Knorpelexplantate mit zellfreiem Fibringel sezernierten eine nicht zu vernachlässigende Menge an *CTGF*, die ungefähr in der Größenordnung von BMSC in Monokultur lag. Deswegen war es nicht möglich, zu sagen, ob die *CTGF*-Expression der BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten durch die erhöhten miR-124a-Level inhibiert wurde. Deshalb wurde als nächstes die *CTGF*-Konzentration in den Fibringel-Proteinlysate gemessen. Hier zeigten sich für BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten keine Unterschiede zu BMSC in Monokultur. Für Chondrozyten deutete sich jedoch an, dass die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten nach 28 Tagen möglicherweise die *CTGF*-Synthese reduzierte. Sollte sich diese Beobachtung in einer größeren Stichprobe bestätigen, wäre dies interessant, da *CTGF* für die ECM-Produktion von Chondrozyten essentiell ist (Nishida *et al.*, 2007). Außerdem fördert *CTGF* die Proliferation von Chondrozyten (Nishida *et al.*, 2002). In OA-Knorpel findet man bei den Chondrozyten, die Cluster bilden und somit proliferieren, eine Überexpression von *CTGF* (Omoto *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass artikuläre Chondrozyten *CTGF* als Reaktion auf OA-bedingte Schäden produzieren, um die Proliferation von Chondrozyten zu steigern und dadurch die ECM-Synthese zu erhöhen (Kubota und Takigawa, 2011). Gestützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse einer *in vivo* Studie mit Ratten, bei der Knorpeldefekte durch Mononatrium-Jodazetat-induzierte (engl. *monosodium iodoacetate*, MIA) OA durch *CTGF*-Injektionen in Gelatinehydrogelen regeneriert werden konnten (Nishida *et al.*, 2004). Somit wäre eine hohe *CTGF*-Konzentration in der Knorpelmikroumgebung für Zell-basierte Knorpelregenerationsstrategien wünschenswert. Vondaher haben OA-Gewebeexplantate einen negativen Effekt auf die kokultivierten Zellen, da durch die induzierte miR-124a-Expression die *CTGF*-Genexpression und Proteinsynthese zum Teil inhibiert wird.

Kokultur mit OA-/N-Knorpelexplantaten führte in BMSC sowie z.T. auch in Chondrozyten und einem Gemisch aus beiden Zelltypen zu erhöhter Expression der miR-29b und parallel zur erniedrigten Expression von *COL1A1* und *COL3A1*. Bei

Kokultur mit Knochenexplantaten waren diese Effekte nicht nachweisbar. Die Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten beeinflusste die von BMSC sezernierte Kollagen-I-Proteinmenge im Zellkulturüberstand nicht. Da aus der Literatur aber bekannt ist, dass miR-29b sowohl in der 3'-UTR der COL1A1-mRNA als auch der COL3A1-mRNA binden kann (Cheng *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2010; Steele *et al.*, 2010), wurde der Effekt von miR-29b auf die Kollagene I und III im Detail untersucht.

5.4 miR-29b reguliert die Expression der Kollagene I und III in chondrogen differenzierenden BMSC in einer OA-Umgebung

Da die Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten zur Induktion der miR-29b-Expression und gleichzeitig zur Inhibition der Expression von *COL1A1* und *COL3A1* in chondrogen differenzierenden BMSC führte, wurde die Rolle von miR-29b während der chondrogenen Differenzierung von BMSC in einer OA-Umgebung und ihr Einfluss auf die Expression der Kollagene I und III genauer analysiert. Außerdem wurde nach regulatorischen Faktoren der miR-29b-Expression gesucht. Die Ergebnisse dieses Teilprojekts wurden in der Fachzeitschrift *Scientific Reports* veröffentlicht (Mayer *et al.*, 2017).

Zunächst wurde untersucht, ob lösliche, vom Knorpelexplantat sezernierte Faktoren die miR-29b-Expression stimulieren und parallel dazu die Expression von *COL1A1* und *COL3A1* herunterreguliert wird oder ob der direkte Kontakt zum Knorpel-explantat dafür notwendig ist. BMSC, die als Micromass Pellets in chondrogenem, mit OA-Knorpelexplantaten konditioniertem Medium (KM) kultiviert wurden, wiesen im Vergleich zu BMSC-Pellets, die in nicht-konditioniertem chondrogenen Medium (NM) kultiviert wurden, höhere miR-29b- und niedrigere *COL1A1*- und *COL3A1*-Expressionslevel auf. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der direkten Kokultur in Fibringelen auf OA-Knorpelexplantaten. Die indirekte Kokultur führte außerdem zu signifikant reduzierten Kollagen I-Proteinleveln im Überstand. Somit konnte gezeigt werden, dass lösliche, vom OA-Knorpelexplantat sezernierte Faktoren die Expression der miR-29b fördern und die Genexpression und Proteinsekretion von Kollagen I und III hemmen. Überexpressions- und Inhibitions-experimente mit einem miR-29b-Mimic bzw. miR-29b-Inhibitor bestätigten, dass höhere miR-29b-Level zu niedrigeren Kollagen I und III Gen- und Proteinlevel führen. BMSC, die mit einem miR-29b-Inhibitor transfiziert und anschließend in KM kultiviert wurden, wiesen höhere *COL1A1*- und *COL3A1*-Level auf als BMSC, die mit einer

non-targeting Kontroll-miR (NT-miR) transfiziert wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte miR-29b-Expression, induziert durch lösliche, von OA-Knorpelexplantaten sezernierte Faktoren, für die reduzierte Kollagen I und III Expression von chondrogen differenzierenden BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelexplantaten verantwortlich ist.

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die Kollagenexpression spielt miR-29b auch eine Rolle beim Überleben und Wachstum von Zellen. Die Mitglieder der miR-29-Familie beeinflussen Proliferation und Apoptose verschiedener Zelltypen. miR-29b fördert die Apoptose z.B. durch Inhibition der Translation anti-apoptotischer Proteine wie Mcl-1 und Bcl-2 (Mott *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2010). Zudem kann miR-29b die Proliferation hemmen (Cui *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013).

BMSC, die in KM kultiviert wurden, zeigten eine gesteigerte Caspase-3/7-Aktivität im Vergleich zu BMSC, die in NM kultiviert wurden. Überexpression von miR-29b durch Transfektion eines Mimics führte ebenfalls zu erhöhter Caspase-3/7-Aktivität verglichen mit BMSC, die mit einer NT-miR transfiziert wurden. BMSC, die mit einem miR-29b-Inhibitor transfiziert und anschließend in KM kultiviert wurden, wiesen eine signifikant schwächere Caspase-3/7-Aktivität auf als mit NT-miR transfizierte BMSC in konditioniertem Medium.

Die Apoptose wird u.a. durch die Regulation der Expression von pro- und anti-apoptotischen Proteinen aus der Bcl-2-Familie beeinflusst. Es wurde beschrieben, dass miR-29b direkt in der 3'-UTR von Mcl-1 und Bcl-2 bindet (Xiong *et al.*, 2010). Beide anti-apoptotischen Proteine sind in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und fördern das zelluläre Überleben. Sie inhibieren die Porenbildung von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bak. So wird die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und dadurch die Freisetzung von Cytochrom C und das Anschalten des programmierten Zelltods durch die Aktivierung von Caspasen verhindert (Elmore, 2007). Ein möglicher Mechanismus, wie miR-29b die Apoptoserate beeinflussen könnte, ist durch die Modulation der Expression von apoptotischen Regulatoren wie die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1. BMSC, die in KM kultiviert wurden, wiesen höhere miR-29b-Level und niedrigere *BCL2*-Level auf, wohingegen die *MCL1*-Level vergleichbar waren mit denen von BMSC, die in NM kultiviert wurden. Überexpression von miR-29b durch Transfektion eines Mimics reduzierte sowohl die *BCL2*- als auch die *MCL1*-Expression signifikant.

Transfektion von BMSC mit einem miR-29b-Inhibitor und anschließende Kultivierung in KM brachte nur die *MCL1*-Expression auf das normale Level zurück. Höhere miR-29b-Level, die durch sezernierte OA-Knorpelfaktoren induziert wurden, förderten die Apoptose von chondrogen differenzierenden BMSC, was sich in der gesteigerten Caspase-3/7-Aktivität zeigte. Die erhöhte Apoptoserate geht z.T. darauf zurück, dass miR-29b direkt die Expression von Regulatoren der Apoptose inhibiert wie die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1. Chen *et al.* (2017) berichteten, dass miR-29b die Apoptose von Ratten-Chondrozyten durch Inhibition von Progranulin fördert, was zu einem veränderten Verhältnis von Bcl2 zu Bax führt und die Proteinlevel von gespaltenen Caspase-3 erhöht.

miR-29b fördert die Apoptose von BMSC in einer OA-Umgebung, spielt jedoch keine Rolle bei der Regulation der Proliferation. BMSC, die in KM kultiviert wurden, wiesen zwar höhere Proliferationsraten auf als BMSC in NM, die Überexpression von miR-29b durch Mimic-Transfektion beeinflusste die Proliferation jedoch nicht. Somit muss ein anderer Mechanismus für die gesteigerte Proliferation, die durch lösliche, vom OA-Knorpelexplantat sezernierte Faktoren induziert wird, verantwortlich sein.

Als nächstes wurde versucht, Faktoren zu identifizieren, die für die Hochregulation der miR-29b-Expression in BMSC während der chondrogenen Differenzierung in einer OA-Umgebung verantwortlich sind. Die indirekte Kokultur mit konditioniertem Medium reicht aus, um die miR-29b-Level zu steigern. Daher handelt es sich um lösliche, vom Knorpelimplantat sezernierte Faktoren, die die miR-29b-Expression regulieren. Es sind verschiedene Mechanismen bekannt, wie die Expression von miRs reguliert werden kann. Entweder wird die Biosynthese bzw. Reifung der miRs beeinflusst oder ihre Aktivität (Davis und Hata, 2009; Ha und Kim, 2014). Die Biosynthese von miR-Genen kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden: pre-transkriptionell durch epigenetische Kontrolle wie z.B. DNA-Methylierung (Lujambio *et al.*, 2008) oder Histonmodifikationen (Scott *et al.*, 2006), auf der Transkriptionsebene durch Transkriptionsfaktoren (Chang *et al.*, 2008), während der Prozessierung des Primär-miR-Transkripts zur reifen miR (Davis und Hata, 2009) und post-transkriptionell durch RNA-Methylierung, Uridylierung oder Adenylierung (Ha und Kim, 2014). Auch die Aktivität von miRs kann durch verschiedene Faktoren reguliert werden, z.B. indem Argonaute-Proteine und die Bildung des RISC-Komplex beeinflusst werden. Der Turnover und die Degradation von miRs, welche durch

Nukleasen kontrolliert wird (Das *et al.*, 2010) regulieren ebenfalls die in der Zelle vorhandene Menge an miRs. Es ist jedoch noch wenig über spezielle Faktoren oder Mechanismen bekannt, welche die Biosynthese der miR-29b regulieren. Im humanen Genom gibt es zwei Gene (MIR29B1 auf Chromosom 7 und MIR29B2 auf Chromosom 1), die für zwei Vorläufer-miRs (miR-29b-1 und miR-29b-2) kodieren. Durch Splicing entstehen dann reife miR-29bs mit identischer Sequenz (Kriegel *et al.*, 2012). Die Promoterregionen dieser beiden Gene weisen verschiedene Bindestellen für mehrere Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myc oder NF- κ B auf, die die Expression von miR-29b supprimieren (Amodio *et al.*, 2015).

Le *et al.* beobachteten, dass die SOX9-Expression von chondrogen differenzierenden MSC bis Tag 7 anstieg und nach 14 Tagen abnahm (Le *et al.*, 2015). Dieses Expressionsmuster war invers korreliert mit der miR-29b-Expression. Weiter zeigten sie, dass eine Überexpression von SOX9 in Chondrosarkomzellen zu einer Abnahme der Expression von Mitgliedern der miR-29-Familie führte, wohingegen ein Sox9-Knockdown ihre Expression steigerte. Da wir in unserem Kokultursystem jedoch keine Änderung der SOX9-Genexpression in BMSC detektiert haben, wurde eine Sox9-abhängige Regulation der miR-29b-Expression ausgeschlossen.

Lösliche, vom OA-Knorpelexplantat ins Medium abgegebene Faktoren induzierten die miR-29b-Expression. Die Analyse von Zellkulturüberständen von OA-Knorpelexplantaten zeigte, dass neben Zytokinen auch Proteasen wie MMP-2 und MMP-9 sezerniert wurden. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob sich die Stimulation der miR-29b-Expression dadurch verhindern lässt, dass die Aktivität von Proteasen im konditionierten Medium durch Zugabe von Proteaseinhibitoren gehemmt wird. Der verwendete Proteaseinhibitorcocktail inhibierte Serin- und Cysteinproteasen. Durch Zugabe von EDTA, einem Chelatbildner, ließen sich zusätzlich auch Matrixmetalloproteinasen inhibieren, denn durch die Chelatisierung der Metallionen aus dem aktiven Zentrum dieser Enzyme verlieren sie ihre katalytische Aktivität. Doch weder durch Zugabe des Proteaseinhibitorcocktails mit EDTA zum KM noch durch den EDTA-freien Proteaseinhibitorcocktail ließ sich die durch KM induzierte Steigerung der miR-29b-Expression und die damit einhergehende Reduktion der COL1A1- und COL3A1-Genexpression im Vergleich zu BMSC in NM verhindern. Deshalb können Proteasen als Regulatoren der miR-29b-Expression in unserem Kokultursystem ausgeschlossen werden.

Inflammatorische Faktoren könnten als Regulatoren der miR-29b-Synthese in Frage kommen, denn Le *et al.* berichteten, dass IL-1 β die Expression von miR-29b in Chondrozyten erhöhte (Le *et al.*, 2015). Im Vorgängerprojekt zu dieser Arbeit wurde beschrieben, dass der Zellkulturüberstand von BMSC in Kokultur mit OA-Knorpel-explantaten signifikant höhere Level an IL-1 β , IL-6 und IL-8 im Vergleich zu BMSC in Monokultur enthielt (Leyh *et al.*, 2014b). Doch weder durch Stimulation mit IL-1 β , IL-6 oder IL-8 ließ sich eine Hochregulation der miR-29b-Expression in BMSC induzieren. Stimulation mit TNF- α schien zwar die COL1A1-Expression zu inhibieren, hatte jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf die miR-29b-Expressionslevel. Von LIF, einem Mitglied der IL-6-Familie, ist beschrieben, dass es die Expression von miR-29c über den JAK/STAT-3-Pathway in Nierenfibroblasten von Ratten erhöhte (Yu *et al.*, 2015). Doch die Stimulation mit LIF hatte keinen Einfluss auf die miR-29b-Expression in chondrogen differenzierenden BMSC. Da *in vivo* sehr wahrscheinlich nicht ein einzelner Faktor, sondern eine Synergie mehrerer Faktoren die Expression von miR-29b regulieren, wurden BMSC auch mit einem Gemisch verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine stimuliert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Roggli *et al.* mit humanen Pankreas-Inselzellen (Roggli *et al.*, 2012) induzierten verschiedene Zytokingemische die miR-29b-Expression von chondrogen differenzierenden BMSC nicht. Es wurde beschrieben, dass die miR-29a/b-1-Promotorregion mehrere sog. GAS-Elemente (*interferon gamma activated sequences*) enthält (Schmitt *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2012). IFN- γ aktiviert den JAK/STAT-Signalweg, wodurch aktivierte STAT-1-Dimere an die GAS-Elemente binden und dadurch die Expression von miR-29b in verschiedenen Melanomzelllinien gesteigert wurde (Schmitt *et al.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zellkulturüberständen von OA-Knorpel-explantaten mittels ELISA kein IFN- γ detektiert. Allerdings konnten Tsuchida *et al.* IFN- γ in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten, aber nicht in OA-Knorpel-extrakten nachweisen, obwohl Chondrozyten IFN- γ produzieren (Tsuchida *et al.*, 2014). Die Stimulation von Zellkulturen mit IFN- γ induzierte die miR-29b-Expression in chondrogen differenzierenden BMSC im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen konzentrationsabhängig. Dies ging mit einer Reduktion der Expression von COL1A1 und COL3A1 einher. Somit scheint IFN- γ ein Regulator der miR-29b-Expression während der chondrogenen Differenzierung von BMSC zu sein.

miR-29b spielt also eine wichtige Rolle während der chondrogenen Differenzierung von BMSC in einer OA-Mikroumgebung. BMSC sind in der Lage, auch unter OA-Bedingungen chondrogen zu differenzieren, denn die Expression von Kollagen II stieg von Tag 7 zu Tag 28 an. Aber miR-29b beeinflusst die BMSC-basierte Knorpelregeneration in einer OA-Umgebung. Sowohl die Expression von Kollagen III, das v.a. von undifferenzierten BMSC exprimiert wird, als auch die Kollagen I-Expression, welche als Marker für dedifferenzierte Chondrozyten gilt, werden beide von miR-29b inhibiert, wodurch sich die Zusammensetzung der neu gebildeten ECM ändert. Es wurde berichtet, dass miR-29b zum veränderten Verhältnis von Kollagen II und I von humanen OA- und dedifferenzierten artikulären Chondrozyten beiträgt (Moulin *et al.*, 2017). Moulin *et al.* zeigten außerdem, dass miR-29b auch in der 3'-UTR der COL2A1-mRNA bindet. Ein direkter inhibitorischer Effekt der miR-29b auf die Kollagen II-Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden, da die miR-29b-Überexpressionsexperimente mit BMSC in Monolayer durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen exprimierten die BMSC trotz chondrogenem Induktionsmedium keine nachweisbaren Mengen an COL2A1. Trotzdem wäre es denkbar, dass die gesteigerte miR-29b-Expression für die reduzierte COL2A1-Expression bei direkter Kokultur von BMSC in Fibringelen auf OA-Knorpelimplantaten zumindest mitverantwortlich sein könnte.

Neben dem inhibitorischen Effekt auf die Kollagenexpression förderte miR-29b die Apoptose von chondrogen differenzierenden BMSC in Kokultur mit OA-Knorpelimplantaten. Dies könnte einerseits einen Kontrollschritt darstellen, um ungünstiges, übermäßiges Zellwachstum zu verhindern, andererseits aber auch einen negativen Effekt haben, wenn dadurch die Apoptose von reifen Chondrozyten gefördert wird (Chen *et al.*, 2017). Ein potentieller induktiver Regulator der miR-29b-Expression ist IFN- γ . Dieses Zytokin wird von OA-Chondrozyten produziert und wurde in Traumaknorpelextrakten sowie in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten und Kontrollpersonen detektiert (Tsuchida *et al.*, 2014). Doch wahrscheinlich wird die Expression von miR-29b nicht durch einen einzigen Faktor reguliert, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren.

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die hohe miR-29b-Expression während der chondrogenen Differenzierung von BMSC in einer OA-Mikroumgebung sowohl positive als auch ungünstige Effekte für die BMSC-basierte OA-Knorpelregeneration hat. Hohe miR-29b-Level fördern die Apoptose. Dadurch wird zwar unkontrolliertes Zellwachstum verhindert, aber auch die Anzahl an BMSC reduziert, die die Chondrogenese durchlaufen. Außerdem inhibiert die erhöhte miR-29b-Expression, die durch lösliche, von OA-Knorpelexplantaten sezernierte Faktoren induziert wird, die Expression der Kollagene I und III. Dadurch wird die Zusammensetzung der neu gebildeten ECM beeinflusst. Dies könnte wichtig sein, um die Bildung von minderwertigem, fibrösem Knorpel zu verhindern und stattdessen die Genese von hyalinem Knorpel zu fördern.

6 Zusammenfassung

Osteoarthritis (OA), eine multifaktorielle, degenerative Erkrankung, die das gesamte Gelenk betrifft, ist v.a. charakterisiert durch einen progressiven und irreversiblen Verlust des artikulären Knorpels. Da Knorpelläsionen nicht spontan heilen und funktionales Knorpelgewebe nicht regeneriert wird, sind für die Regeneration Zellbasierte Strategien mit Chondrozyten oder mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (BMSC) vielversprechend. Vorarbeiten zeigten, dass die Kokultur von BMSC/Chondrozyten mit OA-Knorpel- und OA-Knochenexplantaten zu einer veränderten Zusammensetzung der neugebildeten extrazellulären Matrix (ECM) mit verminderten mechanischen und biochemischen Eigenschaften führte. Um die Qualität von BMSC regeneriertem Knorpelgewebe zu verbessern, ist ein besseres Verständnis der Signale aus der arthrotischen Mikroumgebung wichtig. In dieser Arbeit wurde deshalb die Interaktion zwischen artikulärem Knorpel-/subchondralem Knochenexplantat mit Chondrozyten/chondrogen differenzierenden BMSC untersucht. Denn zum einen kann der artikuläre Knorpel und der subchondrale Knochen die Chondrogenese der BMSC bzw. den Phänotyp der Chondrozyten beeinflussen, zum anderen können die kokultivierten Zellen wiederum einen Einfluss auf den geschädigten Knorpel/Knochen und das intrinsische Knorpelregenerationspotential haben.

Mittels 1D- und 2D-Gelelektrophorese ließen sich keine eindeutigen Unterschiede in der Proteinkomposition von Knorpelimplantaten, die zellfrei oder mit BMSC/Chondrozyten kokultiviert wurden, nachweisen. Als nächstes wurde der gegenseitige Einfluss auf die Proteinsekretion von Knorpelimplantaten und chondrogen differenzierenden BMSC in Kokultur analysiert. Die Kokultur mit BMSC reduzierte die IL-8-Sekretion der Knorpelimplantate, einem regulatorischen Zytokin der Knorpelhomöostase, deutlich. Dies stellt einen anabolen Effekt auf den Knorpelmetabolismus dar und könnte sich somit positiv auf die Knorpelhomöostase auswirken. ECM-Komponenten werden u.a. von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) abgebaut. Kokultur von BMSC mit Knorpelimplantaten führte zu höheren MMP-2-Mengen im Zellkulturüberstand verglichen mit den Zellen und Gewebeimplantaten in Monokultur. Das von den kokultivierten BMSC zusätzlich sezernierte MMP-2 könnte einen negativen, katabolen Effekt auf das Knorpelimplantat haben und den Knorpelabbau verstärken.

Da Kokultur mit OA-Gewebeexplantaten v.a. die Expression von Kollagenen wie Kollagen I, II und III reduzierte, sollten die dafür verantwortlichen reprimierenden Faktoren identifiziert werden. Da als mögliche Modulatoren der Kollagenexpression microRNAs (miRs) als post-transkriptionelle Regulatoren der Genexpression in Betracht kommen, wurde der Einfluss von subchondralen Knochen- und artikulären Knorpel-explantaten auf die Expression von solchen miRs untersucht, die mit der Regulation der Kollagen I-, II- und III-Expression assoziiert sind. miR-675 gilt als SOX9-abhängiger, positiver Regulator von *COL2A1*. Die Kokultur mit Gewebe-explantaten stimulierte die Expression von miR-675, reduzierte aber die *COL2A1*-Expression, was miR-675 als Regulator ausschließt. Da die Expression von *COL2A1* auch direkt durch den Transkriptionsfaktor SOX9 gesteuert werden kann, wurden die Expression von SOX9 und der miR-124a, die SOX9 als potentielles Zielgen hat, untersucht. Die Kokultur mit Gewebeexplantaten beeinflusste die SOX9-Expression nicht, führte allerdings zu erhöhter miR-124a-Expression, was z.T. eine reduzierte CTGF-Gen- und Proteinexpression zur Folge hatte. Dies wäre ein Nachteil für Zell-basierte Knorpelregenerationsstrategien, da CTGF die ECM-Produktion und Proliferation von Chondrozyten begünstigt. Lösliche, von OA-Knorpel-explantaten sezernierte Faktoren induzierten die Expression von miR-29b in chondrogen differenzierenden BMSC, was die Expression der Kollagene I und III inhibierte. Die gesteigerte miR-29b-Expression führte außerdem zu höherer Caspase-3/7-Aktivität und förderte die Apoptose z.T. direkt durch Inhibition der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Mcl-1. Als stimulierender Faktor der miR-29b-Expression wurde IFN- γ identifiziert. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die erhöhte miR-29b-Expression während der chondrogenen Differenzierung von BMSC in einer OA-Mikroumgebung sowohl förderliche als auch unerwünschte Effekte für die BMSC-basierte Knorpelregeneration hat. miR-29b fördert die Apoptose, wodurch unkontrolliertes Zellwachstum verhindert wird, aber auch die Anzahl an BMSC reduziert wird, die die Chondrogenese durchlaufen. Außerdem inhibiert die durch OA-Knorpel induzierte miR-29b-Expression die Expression von Kollagen I, einem Marker für de-differenzierte Chondrozyten, und Kollagen III, das v.a. von undifferenzierten BMSC exprimiert wird. Dadurch wird die Zusammensetzung der neu gebildeten ECM beeinflusst, was die Bildung von minderwertigem, fibrösem anstelle von artikulärem hyalinen Knorpel verhindern könnte.

7 Summary

Osteoarthritis (OA), a multifactorial degenerative disease which affects the whole joint is mainly characterized by a progressive and irreversible loss of articular cartilage. As cartilage lesions do not heal spontaneously and functional cartilage tissue is not regenerated, cell-based strategies for cartilage regeneration using chondrocytes or bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) are promising. Preliminary work demonstrated that coculture of BMSC/chondrocytes with OA cartilage and OA bone explants results in an altered composition of the newly formed extracellular matrix (ECM) with diminished mechanical and biochemical properties. To improve the quality of regenerated cartilage tissue by BMSC a better understanding of the signals from the OA microenvironment is necessary. Therefore, the interaction of articular cartilage and subchondral bone explants with chondrocytes/chondrogenically differentiating BMSC was analyzed in this study. On the one hand, articular cartilage and subchondral bone can influence chondrogenesis of BMSC or the phenotype of chondrocytes and on the other hand, cocultivated cells can affect the impaired cartilage or bone and the intrinsic potential for cartilage regeneration.

Using 1D and 2D gel electrophoresis, no consistent differences in protein composition of cartilage explants cultivated cell-free or with BMSC/chondrocytes was detected. Next, the mutual influence on protein secretion of cartilage explants and chondrogenically differentiating BMSC in coculture was analyzed. Coculture with BMSC significantly reduced cartilage explants' secretion of IL-8, a regulatory cytokine of cartilage homeostasis. This could be interpreted as an anabolic effect on the cartilage metabolism and thus would have a positive effect on cartilage homeostasis. Components of the ECM are degraded by matrix metalloproteinases (MMPs). Coculture of BMSC with cartilage explants resulted in higher MMP-2 concentrations in cell culture supernatants compared to those of cells or tissue explants in monoculture. MMP-2 additionally secreted by cocultivated BMSC may have a negative, catabolic effect on cartilage explants enhancing cartilage degradation.

As coculture with OA tissue explants mainly reduced the expression of collagens like collagen type I, II and III, the factors responsible for this repression should be identified. Since microRNAs (miRs) are known posttranscriptional regulators of gene expression and thus possibly modulate the expression of collagens, the influence of

subchondral bone- and articular cartilage explants on the expression of those miRs was analyzed which are associated with the regulation of collagen type I, II and III expression. miR-675 is described as a SOX9-dependent positive regulator of *COL2A1*. Coculture with cartilage and bone explants stimulated the expression of miR-675 but reduced *COL2A1* expression, hence, miR-675 was excluded to regulate *COL2A1* expression in our system. As expression of *COL2A1* can be also regulated directly by the transcription factor SOX9, expression of SOX9 and miR-124a which targets SOX9, was analyzed. Coculture with tissue explants did not alter SOX9 expression, but led to elevated miR-124a level which resulted in reduced gene and protein expression of CTGF. This seems to be a disadvantage for cell-based cartilage regeneration approaches because CTGF is an important factor for ECM production and proliferation of chondrocytes. Soluble factors secreted by OA cartilage explants induced the expression of miR-29b in chondrogenically differentiating BMSC which inhibited collagen I and III expression. Elevated miR-29b expression resulted in higher caspase 3/7 activity and promoted apoptosis of BMSC in part by directly inhibiting the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1. IFN- γ was identified to stimulate miR-29b expression. It was concluded that enhanced miR-29b expression during chondrogenic differentiation of BMSC in an OA microenvironment has both supportive and possibly also unfavourable effects on BMSC-based OA cartilage regeneration. High miR-29b expression promotes apoptosis preventing excessive cell growth, however also reducing the number of BMSC undergoing chondrogenesis. Furthermore, elevated miR-29b expression induced by OA cartilage inhibits the expression of collagen I, a marker for dedifferentiated chondrocytes, and collagen III, mainly produced by undifferentiated BMSC. Thus, the composition of the newly formed ECM is affected which might avoid formation of inferior fibrocartilage instead of articular hyaline cartilage.

8 Anhang

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau des artikulären Knorpels	3
Abb. 2 Beispiele für die verschiedenen OA-Stadien am Kniegelenk nach Otte	8
Abb. 3 Aufbau des subchondralen Knochens	9
Abb. 4 Differenzierungspotential adulter mesenchymaler Stammzellen (MSC)	13
Abb. 5 Chondrogene Differenzierung und enchondrale Ossifikation	15
Abb. 6 miR-Biogenese und post-transkriptionelle Regulationsmechanismen von Ziel-mRNAs	23
Abb. 7 miRs und Zielgene während der Chondrogenese	25
Abb. 8 Gencluster der Mitglieder der miR-29-Familie	28
Abb. 9 Nukleotid-Sequenzen der Mitglieder der miR-29-Familie	29
Abb. 10 Direkte Kokultur: Zellen in Fibringel auf Gewebeexplantaten	37
Abb. 11 Indirekte Kokultur: Micromass Pellets in konditioniertem Medium	40
Abb. 12 qPCR-Amplifikationskurven	47
Abb. 13 Sequentielle Proteinextraktion	51
Abb. 14 Reaktionsschema der Oxidation von Luminol	56
Abb. 15 Kumulative <i>population doubling level</i> und Proliferationsraten von BMSC ...	67
Abb. 16 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf BMSC	69
Abb. 17 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA-Knorpelexplantat-Proteinextrakte)	71
Abb. 18 Silberfärbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA-Knorpel- explantat-Proteinextrakte)	72
Abb. 19 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinbanden (mono- und kokultivierte OA- und N-Knorpelexplantat-Proteinextrakte)	73
Abb. 20 Nachweis von BMSC, OA- und N-Knorpelexplantaten sezernierter Faktoren im Zellkulturüberstand	75
Abb. 21 IL-8 im Zellkulturüberstand von BMSC, N- und OA-Knorpelexplantaten in Mono- und Kokultur	77
Abb. 22 MMP-2 im Zellkulturüberstand von BMSC, N- und OA-Knorpelexplantaten in Mono- und Kokultur	78
Abb. 23 Einfluss von OA-Knochenexplantaten auf die miR-675- und COL2A1- Genexpression	80

Abb. 24 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf die miR-675-, miR-301- und COL2A1-Genexpression	82
Abb. 25 Einfluss von N-Knorpelimplantaten auf die miR-675- und COL2A1-Genexpression	84
Abb. 26 Einfluss von OA-Knochenimplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression	86
Abb. 27 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression	87
Abb. 28 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf die Sox9-Proteinexpression	89
Abb. 29 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf die CTGF-Proteinexpression	90
Abb. 30 Einfluss von N-Knorpelimplantaten auf die miR-124a-, SOX9- und CTGF-Genexpression	92
Abb. 31 Einfluss von OA-Knochenimplantaten auf die miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression	94
Abb. 32 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression	96
Abb. 33 Einfluss von OA-Knorpelimplantaten auf die Kollagen I-Proteinsekretion kokultivierter BMSC	97
Abb. 34 Einfluss von N-Knorpelimplantaten auf die miR-29b-, COL1A1- und COL3A1-Genexpression	98
Abb. 35 Genexpression und Proteinsekretion von BMSC in KM	100
Abb. 36 Gen- und Proteinexpression von Kollagen I und III in BMSC nach Transfektion mit miR-29b-Mimic und Inhibitor	102
Abb. 37 Quantifizierung der Caspase-3/7-Aktivität von BMSC	103
Abb. 38 Expression von Genen, die mit der Regulation der Apoptose in Verbindung stehen	104
Abb. 39 Quantifizierung des BrdU-Einbaus während der DNA-Synthese	105
Abb. 40 Genexpression von BMSC, die in konditioniertem Medium versetzt mit Proteaseinhibitoren kultiviert wurden	106
Abb. 41 Genexpression von BMSC nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen	108
Abb. 42 Regulation der COL2A1-Expression	117

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zusammensetzung ausgewählter fibrillärer Kollagentripelhelices	5
Tab. 2 Proliferationsmedium für BMSC	33
Tab. 3 Einfriermedium für BMSC	33
Tab. 4 FACS-Puffer	34
Tab. 5 Antikörper und Isotypkontrollen	34
Tab. 6 Verdaumedium	35
Tab. 7 Proliferationsmedium für Chondrozyten	35
Tab. 8 Einfriermedium für Chondrozyten	35
Tab. 9 Fibringle	38
Tab. 10 Chondrogenes Differenzierungsmedium	38
Tab. 11 Transfektionsansatz	41
Tab. 12 Stimulation von BMSC mit verschiedenen Zytokinen	42
Tab. 13 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese (miRs)	45
Tab. 14 TaqMan MicroRNA Assays	45
Tab. 15 Programm für die cDNA-Synthese (miRs)	45
Tab. 16 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese (Zielgene)	46
Tab. 17 Reaktionsansatz für qPCR (miRs)	48
Tab. 18 Programm für qPCR (miRs)	48
Tab. 19 Primersequenzen für die qPCR (Zielgene)	49
Tab. 20 Reaktionsansatz für qPCR (Zielgene)	49
Tab. 21 Programm für qPCR (Zielgene)	49
Tab. 22 Deglykosylierungspuffer	51
Tab. 23 NaCl-Extraktionspuffer	51
Tab. 24 GdnHCl-Extraktionspuffer	52
Tab. 25 Resolubilisierungspuffer	52
Tab. 26 Pepsinpuffer	53
Tab. 27 Präzipitationspuffer	53
Tab. 28 SDS-Ladepuffer	54
Tab. 29 Elektrophoresepuffer	54
Tab. 30 Zusammensetzung der Maxi-Gradientengele	55
Tab. 31 Bedingungen für die Elektrophorese	55
Tab. 32 Transferpuffer	57

Tab. 33 Bedingungen für den Proteintransfer	57
Tab. 34 TBS-T	57
Tab. 35 Blocklösung	57
Tab. 36 Verwendete Antikörper für Western Blots.....	58
Tab. 37 Coomassie-Lösung.....	59
Tab. 38 Entfärber I.....	59
Tab. 39 Entfärber II.....	59
Tab. 40 Fixierlösung	60
Tab. 41 Silbernitratlösung.....	60
Tab. 42 Entwicklerlösung.....	60
Tab. 43 Entwässerungslösung	60
Tab. 44 Zymogramm-Ladepuffer	61
Tab. 45 Zymogramm-Entwicklerlösung	61
Tab. 46 Lister der gemessenen Analyte	64
Tab. 47 Expression von Oberflächenmarkern auf BMSC	68

III. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ACI	<i>autologous chondrocyte implantation</i>
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ALP	alkalische Phosphatase
AMIC	autologe Matrix-induzierte Chondrogenese
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i> , knochenmorphogenetisches Protein
BMSC	<i>bone marrow-derived mesenchymal stem cell</i> , mesenchymale Knochenmarksstammzelle
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin
Caspase	<i>cysteine aspartic acid-specific protease</i>
CC	<i>calcified cartilage</i> , kalzifizierter Knorpel
CCN	<i>cysteine-rich protein 61 (Cyr61)</i> , <i>connectiv tissue growth factor (CTGF)</i> , <i>nephroblastoma overexpressed protein (Nov)</i>
CD	cluster of differentiation
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Ch	Chondrozyten
Chr	Chromosom
cm ²	Quadratzentimeter

Abkürzung	Bedeutung
c-Myc	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha 1
COL2A1	Kollagen Typ II, alpha 1
COL3A1	Kollagen Typ III, alpha 1
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPC	<i>chondrocyte progenitor cell</i>
CPDL	<i>cumulative population doubling level</i>
CSC	<i>cartilage stem cell</i>
CT	threshold cycle
CTGF	<i>connectiv tissue growth factor</i>
Cu	Kupferion
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	zellfreies Fibringel
FACIT	<i>fibril associated collagens with interrupted triple helices</i> , Fibrillenassoziierte Kollagene
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblas growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm

Abkürzung	Bedeutung
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>IFN-gamma activated sequence</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
ggf.	gegebenenfalls
GOI	<i>gene of interest</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
hsa	Homo sapiens (Mensch)
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> , hämatopoetische Stammzelle
ICAT	<i>isotope-coded affinity tag</i> , Isotopen-codierte Affinitätsmarkierung
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
Ihh	<i>indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KM	konditioniertes Medium
L	Liter
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i> , Leukämiehemmender Faktor
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
M	molar
mA	Milliampere
MACI	Matrix-induzierte autologe Chondrozyten-Implantation
Mcl-1	<i>myeloid leukemia cell differentiation protein 1</i>

Abkürzung	Bedeutung
MIA	<i>monosodium iodoacetate</i> , Mononatrium-Jodazetat
min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mmu	<i>Mus musculus</i> (Maus)
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> , mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
N	nicht-OA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NC-Domäne	<i>non-collagenous domain</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NM	nicht-konditioniertes Medium
nm	Nanometer
NORM	<i>normalizer</i>
NSAID	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug</i> , nichtsteroidaler Entzündungshemmer
nt	Nukleotid
NT-miR	<i>non-targeting</i> Kontroll-miR, Negativkontrolle
OA	Osteoarthrose
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OD	optische Dichte
P	Passage
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDL	<i>population doubling level</i>
PE	Phycoerythrin

Abkürzung	Bedeutung
POD	Peroxidase
pre-miRNA	<i>precursor microRNA</i> , Vorläufer-miR
pri-miRNA	<i>primary microRNA</i> , Primär-miR
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i> , Radioimmunpräzipitationsassay
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rno	Rattus norvegicus (Ratte)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RQ	<i>relative quantification</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s	Sekunde
SBP	<i>subchondral bone plate</i> , subchondrale Knochenplatte
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLRP	<i>small leucine-rich repeat proteoglycan</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
sog.	sogenannt
Sox	<i>SRY-related (sex determining region of Y gene) HMG (high-mobility group) box</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STB	<i>subchondral trabecular bone</i> , subchondraler trabekulärer Knochen
STZ	<i>superficial tangential zone</i> , Tangentialzone
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Trisgepufferte Salzlösung
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>

Abkürzung	Bedeutung
Tcl-1	<i>T-cell leukemia/lymphoma 1</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

IV. Herstellerverzeichnis

Da während der Zeit, in der die Experimente zu dieser Arbeit durchgeführt wurden, zahlreiche Firmen von anderen übernommen wurden und sich somit der Hersteller geändert hat, aber Markennamen bzw. Produktlinienbezeichnungen meist beibehalten wurden, ist in folgender Tabelle der frühere Name mit angegeben.

Produktlinie, Marke, Unternehmen	Firmensitz
Abcam	Cambridge, UK
Affymetrix, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Ambion, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
B. Braun Biotech International	Melsungen, Deutschland
Bandelin electronic	Berlin, Deutschland
Baxter Deutschland	Unterschleißheim, Deutschland
BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, USA
Biochrom	Berlin, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories Deutschland	München, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Corning	Corning, USA
Epicentre, Illumina	Madison, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falcon, Corning	Corning, USA
Feather Safety Razor	Osaka, Japan
Fluka, Sigma-Aldrich, Merck	Darmstadt, Deutschland
Gibco, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
GraphPad Software	La Jolla, USA
Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Jackson ImmunoResearch Laboratories	West Grove, USA
Lonza Group	Basel, Schweiz

Produktlinie, Marke, Unternehmen	Firmensitz
Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microsynth	Balgach, Schweiz
Millipore, Merck	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Nicon	Tokyo, Japan
Nunc, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
OmniKine, Assay Biotechnology Company	Sunnyvale, USA
Peptotech Germany	Hamburg, Deutschland
Peqlab Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Pierce, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Promega Corporation	Fitchburg, USA
R&D Systems, Bio-Techne	Minneapolis, USA
RayBiotech	Norcross, USA
Roche	Basel, Schweiz
Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich, Merck	Darmstadt, Deutschland
Stiefel, Glaxo Smith Kline	Brentford, UK
Stratagene, Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Tecan Group	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Treestar	Ashland, USA
Vilber Lourmat	Eberhardzell, Deutschlande
Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, USA

9 Literaturverzeichnis

Abbott, J., und Holtzer, H. (1966). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. 3. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. *The Journal of cell biology* 28, 473-487.

Acharya, C., Adesida, A., Zajac, P., Mumme, M., Riesle, J., Martin, I., und Barbero, A. (2012). Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *Journal of cellular physiology* 227, 88-97.

Adatia, A., Rainsford, K.D., und Kean, W.F. (2012). Osteoarthritis of the knee and hip. Part I: aetiology and pathogenesis as a basis for pharmacotherapy. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 64, 617-625.

Ahmed, T.A., Dare, E.V., und Hincke, M. (2008). Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue engineering Part B, Reviews* 14, 199-215.

Ahrens, P.B., Solursh, M., und Reiter, R.S. (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Developmental biology* 60, 69-82.

Alegria-Schaffer, A., Lodge, A., und Vatter, K. (2009). Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in enzymology* 463, 573-599.

Amodio, N., Rossi, M., Raimondi, L., Pitari, M.R., Botta, C., Tagliaferri, P., und Tassone, P. (2015). miR-29s: a family of epi-miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies. *Oncotarget* 6, 12837-12861.

Andriacchi, T.P., Mundermann, A., Smith, R.L., Alexander, E.J., Dyrby, C.O., und Koo, S. (2004). A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. *Annals of biomedical engineering* 32, 447-457.

Aung, A., Gupta, G., Majid, G., und Varghese, S. (2011). Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism* 63, 148-158.

Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., und Murphy, J.M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental cell research* 268, 189-200.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Barter, M.J., Tselepi, M., Gomez, R., Woods, S., Hui, W., Smith, G.R., Shanley, D.P., Clark, I.M., und Young, D.A. (2015). Genome-Wide MicroRNA and Gene Analysis of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Identifies an Essential Role and Multiple Targets for miR-140-5p. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33, 3266-3280.

- Bell**, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., Sham, M.H., Koopman, P., Tam, P.P., und Cheah, K.S. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature genetics* 16, 174-178.
- Belluoccio**, D., Wilson, R., Thornton, D.J., Wallis, T.P., Gorman, J.J., und Bateman, J.F. (2006). Proteomic analysis of mouse growth plate cartilage. *Proteomics* 6, 6549-6553.
- Benthien**, J.P., und **Behrens**, P. (2011). The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 19, 1316-1319.
- Bhosale**, A.M., und **Richardson**, J.B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin* 87, 77-95.
- Bian**, L., Zhai, D.Y., Mauck, R.L., und **Burdick**, J.A. (2011). Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue engineering Part A* 17, 1137-1145.
- Bös**, L., und **Ellermann**, A. (2003). Indikation und Ergebnisse der autologen Knorpel-Knochen-Transplantation (Mosaikplastik). *DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN* 54, 222-224.
- Brew**, K., und **Nagase**, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 55-71.
- Brigstock**, D.R. (1999). The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine reviews* 20, 189-206.
- Brittberg**, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., und Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine* 331, 889-895.
- Buckwalter**, J.A., und **Mankin**, H.J. (1997). Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *J Bone Joint Surg* 79, 600-611.
- Buckwalter**, J.A., Mankin, H.J., und Grodzinsky, A.J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures* 54, 465-480.
- Buckwalter**, J.A., Mow, V.C., und Ratcliffe, A. (1994). Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2, 192-201.
- Burke**, J., Hunter, M., Kolhe, R., Isales, C., Hamrick, M., und Fulzele, S. (2016). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell based therapy for osteoarthritis. *Clinical and translational medicine* 5, 27.
- Burrage**, P.S., Mix, K.S., und Brinckerhoff, C.E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11, 529-543.

- Cai, X., und Cullen, B.R. (2007).** The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* (New York, NY) *13*, 313-316.
- Caplan, A.I. (1991).** Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* *9*, 641-650.
- Chacko, S., Abbott, J., Holtzer, S., und Holtzer, H. (1969).** The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *The Journal of experimental medicine* *130*, 417-442.
- Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., und Mendell, J.T. (2008).** Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics* *40*, 43-50.
- Chen, L., Li, Q., Wang, J., Jin, S., Zheng, H., Lin, J., He, F., Zhang, H., Ma, S., Mei, J., et al. (2017).** MiR-29b-3p promotes chondrocyte apoptosis and facilitates the occurrence and development of osteoarthritis by targeting PGRN. *Journal of cellular and molecular medicine*.
- Chen, P., Vukicevic, S., Sampath, T.K., und Luyten, F.P. (1993).** Bovine articular chondrocytes do not undergo hypertrophy when cultured in the presence of serum and osteogenic protein-1. *Biochemical and biophysical research communications* *197*, 1253-1259.
- Cheng, J., Wang, Y., Wang, D., und Wu, Y. (2013).** Identification of collagen 1 as a post-transcriptional target of miR-29b in skin fibroblasts: therapeutic implication for scar reduction. *The American journal of the medical sciences* *346*, 98-103.
- Cheng, L.C., Pastrana, E., Tavazoie, M., und Doetsch, F. (2009).** miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience* *12*, 399-408.
- Cole, A.G. (2011).** A review of diversity in the evolution and development of cartilage: the search for the origin of the chondrocyte. *European cells & materials* *21*, 122-129.
- Cui, G.H., Wang, Y.Y., Li, C.J., Shi, C.H., und Wang, W.S. (2016).** Efficacy of mesenchymal stem cells in treating patients with osteoarthritis of the knee: A meta-analysis. *Experimental and therapeutic medicine* *12*, 3390-3400.
- Cui, Y., Su, W.Y., Xing, J., Wang, Y.C., Wang, P., Chen, X.Y., Shen, Z.Y., Cao, H., Lu, Y.Y., und Fang, J.Y. (2011).** MiR-29a inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest through the downregulation of p42.3 in human gastric cancer. *PloS one* *6*, e25872.
- Dai, L., Zhang, X., Hu, X., Zhou, C., und Ao, Y. (2012).** Silencing of microRNA-101 prevents IL-1beta-induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis research & therapy* *14*, R268.

- Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.Z., Sarkar, D., und Fisher, P.B. (2010).** Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11948-11953.
- Davis, B.N., und Hata, A. (2009).** Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell communication and signaling : CCS* 7, 18.
- Diao, H.J., Yeung, C.W., Yan, C.H., Chan, G.C., und Chan, B.P. (2013).** Bidirectional and mutually beneficial interactions between human mesenchymal stem cells and osteoarthritic chondrocytes in micromass co-cultures. *Regenerative medicine* 8, 257-269.
- Diaz-Prado, S., Cicione, C., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Oreiro, N., Fernandez-Lopez, C., und Blanco, F.J. (2012).** Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC musculoskeletal disorders* 13, 144.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., und Horwitz, E. (2006).** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A., und Dreyfuss, G. (2003).** Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA (New York, NY)* 9, 180-186.
- Dudek, K.A., Lafont, J.E., Martinez-Sanchez, A., und Murphy, C.L. (2010).** Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *The Journal of biological chemistry* 285, 24381-24387.
- Duerr, S., Stremme, S., Soeder, S., Bau, B., und Aigner, T. (2004).** MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage. *Clinical and experimental rheumatology* 22, 603-608.
- Dweep, H., und Gretz, N. (2015).** miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods* 12, 697.
- Elmore, S. (2007).** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35, 495-516.
- Eyre, D. (2002).** Collagen of articular cartilage. *Arthritis research* 4, 30-35.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J., und Pelletier, J.P. (2002).** The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237-246.
- Fickert, S., Fiedler, J., und Brenner, R.E. (2004).** Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis research & therapy* 6, R422-432.

- Filardo, G.,** Perdisa, F., Roffi, A., Marcacci, M., und Kon, E. (2016). Stem cells in articular cartilage regeneration. *Journal of orthopaedic surgery and research* 11, 42.
- Florine, E.M.,** Miller, R.E., Porter, R.M., Evans, C.H., Kurz, B., und Grodzinsky, A.J. (2013). Effects of Dexamethasone on Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis and Aggrecanase Activity: Comparison of Agarose and Self-Assembling Peptide Scaffolds. *Cartilage* 4, 63-74.
- Forsyth, C.B.,** Cole, A., Murphy, G., Bienias, J.L., Im, H.J., und Loeser, R.F., Jr. (2005). Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 60, 1118-1124.
- Francis, G.L.** (2010). Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology* 62, 1-16.
- Friedenstein, A.J.,** Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., und Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247.
- Friedman, R.C.,** Farh, K.K., Burge, C.B., und Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19, 92-105.
- Galasso, O.,** Familiari, F., De Gori, M., und Gasparini, G. (2012). Recent findings on the role of gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and -9) in osteoarthritis. *Advances in orthopedics* 2012, 834208.
- Geyer, M.,** Grässel, S., Straub, R.H., Schett, G., Dinser, R., Grifka, J., Gay, S., Neumann, E., und Muller-Ladner, U. (2009). Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 328-335.
- Gibson, G.,** und **Asahara, H.** (2013). microRNAs and cartilage. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31, 1333-1344.
- Goldring, M.B.** (2000). Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Current rheumatology reports* 2, 459-465.
- Goldring, M.B.** (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 4, 269-285.
- Goldring, M.B.,** und **Goldring, S.R.** (2007). Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* 213, 626-634.
- Goldring, M.B.,** und **Goldring, S.R.** (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, 230-237.

- Goldring**, M.B., Tsuchimochi, K., und Ijiri, K. (2006). The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 97, 33-44.
- Grabowski**, P. (2015). Physiology of Bone. *Endocrine development* 28, 33-55.
- Grässel**, S., und **Ahmed**, N. (2007). Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, 4946-4956.
- Grässel**, S., und **Lorenz**, J. (2014). Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells. *Current rheumatology reports* 16, 452.
- Guerit**, D., Brondello, J.M., Chuchana, P., Philipot, D., Toupet, K., Bony, C., Jorgensen, C., und Noel, D. (2014). FOXO3A regulation by miRNA-29a Controls chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and cartilage formation. *Stem cells and development* 23, 1195-1205.
- Guilak**, F., Fermor, B., Keefe, F.J., Kraus, V.B., Olson, S.A., Pisetsky, D.S., Setton, L.A., und Weinberg, J.B. (2004). The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical orthopaedics and related research*, 17-26.
- Guo**, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., und Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Guo**, L., Zhao, R.C., und Wu, Y. (2011). The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 39, 608-616.
- Gupta**, P.K., Das, A.K., Chullikana, A., und Majumdar, A.S. (2012). Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem cell research & therapy* 3, 25.
- Ha**, M., und **Kim**, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 509-524.
- Han**, J., Yang, T., Gao, J., Wu, J., Qiu, X., Fan, Q., und Ma, B. (2010). Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *International journal of molecular medicine* 25, 377-384.
- Hannan**, M.T., Felson, D.T., und Pincus, T. (2000). Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *The Journal of rheumatology* 27, 1513-1517.
- Hausmann**, E., und **Neuman**, W.F. (1961). Conversion of proline to hydroxyproline and its incorporation into collagen. *The Journal of biological chemistry* 236, 149-152.
- Hong**, E., und **Reddi**, A.H. (2012). MicroRNAs in chondrogenesis, articular cartilage, and osteoarthritis: implications for tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews* 18, 445-453.

- Huang, W.**, Zhou, X., Lefebvre, V., und de Crombrughe, B. (2000). Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Molecular and cellular biology* 20, 4149-4158.
- Hubka, K.M.**, Dahlin, R.L., Meretoja, V.V., Kasper, F.K., und Mikos, A.G. (2014). Enhancing chondrogenic phenotype for cartilage tissue engineering: monoculture and coculture of articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Tissue engineering Part B, Reviews* 20, 641-654.
- Hunziker, E.B.** (1999). Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 7, 15-28.
- Hwang, N.S.**, Varghese, S., Puleo, C., Zhang, Z., und Elisseeff, J. (2007). Morphogenetic signals from chondrocytes promote chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology* 212, 281-284.
- Iliopoulos, D.**, Malizos, K.N., Oikonomou, P., und Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PloS one* 3, e3740.
- Jackson, A.**, und **Gu, W.** (2009). TRANSPORT PROPERTIES OF CARTILAGINOUS TISSUES. *Current rheumatology reviews* 5, 40.
- Jiang, Y.**, und **Tuan, R.S.** (2015). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology* 11, 206-212.
- Johnstone, B.**, Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., und Yoo, J.U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 265-272.
- Jones, S.W.**, Watkins, G., Le Good, N., Roberts, S., Murphy, C.L., Brockbank, S.M., Needham, M.R., Read, S.J., und Newham, P. (2009). The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 464-472.
- Kadler, K.E.**, Baldock, C., Bella, J., und Boot-Handford, R.P. (2007). Collagens at a glance. *Journal of cell science* 120, 1955-1958.
- Kellgren, J.H.**, und **Lawrence, J.S.** (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis. *Annals of the rheumatic diseases* 16, 494-502.
- Kim, Y.S.**, Choi, Y.J., und Koh, Y.G. (2015). Mesenchymal stem cell implantation in knee osteoarthritis: an assessment of the factors influencing clinical outcomes. *The American journal of sports medicine* 43, 2293-2301.

- Kobayashi, T., Lu, J., Cobb, B.S., Rodda, S.J., McMahon, A.P., Schipani, E., Merckenschlager, M., und Kronenberg, H.M. (2008).** Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 1949-1954.
- Kriegel, A.J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., und Liang, M. (2012).** The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiological genomics* 44, 237-244.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. (2006).** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95-125.
- Kubota, S., und Takigawa, M. (2011).** The role of CCN2 in cartilage and bone development. *Journal of cell communication and signaling* 5, 209-217.
- Kuroda, R., Ishida, K., Matsumoto, T., Akisue, T., Fujioka, H., Mizuno, K., Ohgushi, H., Wakitani, S., und Kurosaka, M. (2007).** Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15, 226-231.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., und Tuschl, T. (2001).** Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY)* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., und Tuschl, T. (2002).** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB* 12, 735-739.
- Le, L.T., Swingle, T.E., Crowe, N., Vincent, T.L., Barter, M.J., Donell, S.T., Delany, A.M., Dalmay, T., Young, D.A., und Clark, I.M. (2015).** The microRNA-29 family in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*.
- Lee, J.H., Fitzgerald, J.B., Dimicco, M.A., und Grodzinsky, A.J. (2005).** Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis and rheumatism* 52, 2386-2395.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., und Ambros, V. (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, S., Yoon, D.S., Paik, S., Lee, K.M., Jang, Y., und Lee, J.W. (2014).** MicroRNA-495 Inhibits Chondrogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells by Targeting Sox9. *Stem cells and development*.
- Leyh, M., Seitz, A., Durselen, L., Schaumburger, J., Ignatius, A., Grifka, J., und Grassel, S. (2014a).** Subchondral bone influences chondrogenic differentiation and collagen production of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. *Arthritis research & therapy* 16, 453.

- Leyh, M., Seitz, A., Durselen, L., Springorum, H.R., Angele, P., Ignatius, A., Grifka, J., und Grässel, S. (2014b).** Osteoarthritic cartilage explants affect extracellular matrix production and composition in cocultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. *Stem cell research & therapy* 5, 77.
- Li, G., Yin, J., Gao, J., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Zhang, C., und Zheng, M.H. (2013).** Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis research & therapy* 15, 223.
- Litwic, A., Edwards, M.H., Dennison, E.M., und Cooper, C. (2013).** Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British medical bulletin* 105, 185-199.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., und Goldring, M.B. (2012).** Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and rheumatism* 64, 1697-1707.
- Loring, J.F., und Peterson, S.E. (2012).** Human stem cell manual : a laboratory guide, 2nd edn (London, UK ; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press).
- Lozito, T.P., und Tuan, R.S. (2011).** Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *Journal of cellular physiology* 226, 385-396.
- Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Roper, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., et al. (2008).** A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13556-13561.
- Lv, X.B., Jiao, Y., Qing, Y., Hu, H., Cui, X., Lin, T., Song, E., und Yu, F. (2011).** miR-124 suppresses multiple steps of breast cancer metastasis by targeting a cohort of pro-metastatic genes in vitro. *Chinese journal of cancer* 30, 821-830.
- Madry, H., van Dijk, C.N., und Mueller-Gerbl, M. (2010).** The basic science of the subchondral bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 18, 419-433.
- Makris, E.A., Gomoll, A.H., Malizos, K.N., Hu, J.C., und Athanasiou, K.A. (2015).** Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nature reviews Rheumatology* 11, 21-34.
- Mamidi, M.K., Das, A.K., Zakaria, Z., und Bhonde, R. (2016).** Mesenchymal stromal cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 24, 1307-1316.
- Man, G.S., und Mologhianu, G. (2014).** Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of medicine and life* 7, 37-41.

- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., und Zarins, A. (1971).** Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. The Journal of bone and joint surgery American volume 53, 523-537.
- Maroudas, A., Palla, G., und Gilav, E. (1992).** Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. Connective tissue research 28, 161-169.
- Martinez-Sanchez, A., Dudek, K.A., und Murphy, C.L. (2012).** Regulation of human chondrocyte function through direct inhibition of cartilage master regulator SOX9 by microRNA-145 (miRNA-145). The Journal of biological chemistry 287, 916-924.
- Martinez-Sanchez, A., und Murphy, C.L. (2013).** MiR-1247 functions by targeting cartilage transcription factor SOX9. The Journal of biological chemistry.
- Matziolis, G., und Rohner, E. (2015).** [Arthritis of the Medial Knee Joint Compartment]. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie 153, 553-564; quiz 565-556.
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jungel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Distler, J.H., et al. (2010).** MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. Arthritis and rheumatism 62, 1733-1743.
- Mayer, U., Benditz, A., und Grässel, S. (2017).** miR-29b regulates expression of collagens I and III in chondrogenically differentiating BMSC in an osteoarthritic environment. Scientific reports 7, 13297.
- Mello, M.A., und Tuan, R.S. (1999).** High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. In vitro cellular & developmental biology Animal 35, 262-269.
- Mirzamohammadi, F., Papaioannou, G., und Kobayashi, T. (2014).** MicroRNAs in cartilage development, homeostasis, and disease. Current osteoporosis reports 12, 410-419.
- Miyaki, S., Sato, T., Inoue, A., Otsuki, S., Ito, Y., Yokoyama, S., Kato, Y., Takemoto, F., Nakasa, T., Yamashita, S., et al. (2010).** MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. Genes & development 24, 1173-1185.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., und Gores, G.J. (2007).** mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene 26, 6133-6140.
- Mott, J.L., Kurita, S., Cazanave, S.C., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., und Fernandez-Zapico, M.E. (2010).** Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. Journal of cellular biochemistry 110, 1155-1164.

- Moulin**, D., Salone, V., Koufany, M., Clement, T., Behm-Ansmant, I., Branlant, C., Charpentier, B., und Jouzeau, J.Y. (2017). MicroRNA-29b Contributes to Collagens Imbalance in Human Osteoarthritic and Dedifferentiated Articular Chondrocytes. *BioMed research international* 2017, 9792512.
- Mueller**, M.B., Blunk, T., Appel, B., Maschke, A., Goepferich, A., Zellner, J., Englert, C., Prantl, L., Kujat, R., Nerlich, M., *et al.* (2013). Insulin is essential for in vitro chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells and influences chondrogenesis in a dose-dependent manner. *International orthopaedics* 37, 153-158.
- Murphy**, M.B., Moncivais, K., und Caplan, A.I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine* 45, e54.
- Musumeci**, G., Aiello, F.C., Szychlińska, M.A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., und Mobasher, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International journal of molecular sciences* 16, 6093-6112.
- Nishida**, T., Kawaki, H., Baxter, R.M., Deyoung, R.A., Takigawa, M., und Lyons, K.M. (2007). CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) is essential for extracellular matrix production and integrin signaling in chondrocytes. *Journal of cell communication and signaling* 1, 45-58.
- Nishida**, T., Kubota, S., Kojima, S., Kuboki, T., Nakao, K., Kushibiki, T., Tabata, Y., und Takigawa, M. (2004). Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, 1308-1319.
- Nishida**, T., Kubota, S., Nakanishi, T., Kuboki, T., Yosimichi, G., Kondo, S., und Takigawa, M. (2002). CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes. *Journal of cellular physiology* 192, 55-63.
- Omoto**, S., Nishida, K., Yamaai, Y., Shibahara, M., Nishida, T., Doi, T., Asahara, H., Nakanishi, T., Inoue, H., und Takigawa, M. (2004). Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12, 771-778.
- Otte**, P. (1969). Die konservative Behandlung der Hüft-und Kniearthrose und ihre Gefahren. *Dtsch Med Jahresschr* 20, 604-609.
- Park**, J., Gebhardt, M., Golovchenko, S., Perez-Branguli, F., Hattori, T., Hartmann, C., Zhou, X., deCrombrughe, B., Stock, M., Schneider, H., *et al.* (2015). Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biology open* 4, 608-621.

- Pasquinelli**, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- Peeters**, C.M., Leijts, M.J., Reijman, M., van Osch, G.J., und Bos, P.K. (2013). Safety of intra-articular cell-therapy with culture-expanded stem cells in humans: a systematic literature review. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 21, 1465-1473.
- Pekarsky**, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C.G., Rassenti, L., *et al.* (2006). Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer research* 66, 11590-11593.
- Perbal**, B. (2004). CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* (London, England) 363, 62-64.
- Peterson** L, M.D., Grande D, Pitman M (1984). Chondrocyte transplantation – an experimental model in rabbits. *Orthopedic Research Society* 218, abstract.
- Peterson**, L., Minas, T., Brittberg, M., Nilsson, A., Sjogren-Jansson, E., und Lindahl, A. (2000). Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clinical orthopaedics and related research*, 212-234.
- Pittenger**, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., und Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)* 284, 143-147.
- Poole**, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., und Lavery, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research*, S26-33.
- Pritzker**, K.P., Gay, S., Jimenez, S.A., Ostergaard, K., Pelletier, J.P., Revell, P.A., Salter, D., und van den Berg, W.B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14, 13-29.
- Real**, F.M., Sekido, R., Lupianez, D.G., Lovell-Badge, R., Jimenez, R., und Burgos, M. (2013). A microRNA (mmu-miR-124) prevents Sox9 expression in developing mouse ovarian cells. *Biology of reproduction* 89, 78.
- Ricard-Blum**, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a004978.
- Roggli**, E., Gattesco, S., Caille, D., Briet, C., Boitard, C., Meda, P., und Regazzi, R. (2012). Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice. *Diabetes* 61, 1742-1751.

Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *European cells & materials* 12, 92-101.

Ryseck, R.P., Macdonald-Bravo, H., Mattei, M.G., und Bravo, R. (1991). Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 2, 225-233.

Sakai, T., Kambe, F., Mitsuyama, H., Ishiguro, N., Kurokouchi, K., Takigawa, M., Iwata, H., und Seo, H. (2001). Tumor necrosis factor alpha induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCS-2/8 cells through activation of NF-kappaB: abrogation of the tumor necrosis factor alpha effect by proteasome inhibitors. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16, 1272-1280.

San Antonio, J.D., und Tuan, R.S. (1986). Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Developmental biology* 115, 313-324.

Scharstuhl, A., Schewe, B., Benz, K., Gaissmaier, C., Buhring, H.J., und Stoop, R. (2007). Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 3244-3251.

Schmitt, M.J., Philippidou, D., Reinsbach, S.E., Margue, C., Wienecke-Baldacchino, A., Nashan, D., Behrmann, I., und Kreis, S. (2012). Interferon-gamma-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells. *Cell communication and signaling : CCS* 10, 41.

Schneider, S., Schmitt, G., Mau, H., Schmitt, H., Sabo, D., und Richter, W. (2005). [Prevalence and correlates of osteoarthritis in Germany. Representative data from the First National Health Survey]. *Der Orthopade* 34, 782-790.

Scott, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., und Benz, C.C. (2006). Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer research* 66, 1277-1281.

Scotti, C., Tonnarelli, B., Papadimitropoulos, A., Scherberich, A., Schaeren, S., Schauerte, A., Lopez-Rios, J., Zeller, R., Barbero, A., und Martin, I. (2010). Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7251-7256.

Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., und Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.

Seol, D., McCabe, D.J., Choe, H., Zheng, H., Yu, Y., Jang, K., Walter, M.W., Lehman, A.D., Ding, L., Buckwalter, J.A., et al. (2012). Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis and rheumatism* 64, 3626-3637.

- Shi, W.**, Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., *et al.* (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer research* 71, 2926-2937.
- Shingu, M.**, Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T., und Nobunaga, M. (1993). The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clinical and experimental immunology* 94, 145-149.
- Shlopov, B.V.**, Lie, W.R., Mainardi, C.L., Cole, A.A., Chubinskaya, S., und Hasty, K.A. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis and rheumatism* 40, 2065-2074.
- Sinusas, K.** (2012). Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *American family physician* 85, 49-56.
- Smith, K.M.**, Guerau-de-Arellano, M., Costinean, S., Williams, J.L., Bottoni, A., Mavrikis Cox, G., Satoskar, A.R., Croce, C.M., Racke, M.K., Lovett-Racke, A.E., *et al.* (2012). miR-29ab1 deficiency identifies a negative feedback loop controlling Th1 bias that is dysregulated in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 189, 1567-1576.
- Soder, S.**, und **Aigner, T.** (2011). [Osteoarthritis. Etiology, typing, staging and histological grading]. *Der Pathologe* 32, 183-192.
- Soder, S.**, Roach, H.I., Oehler, S., Bau, B., Haag, J., und Aigner, T. (2006). MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage. *Clinical and experimental rheumatology* 24, 302-304.
- Sophia Fox, A.J.**, Bedi, A., und Rodeo, S.A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health* 1, 461-468.
- Sorrentino, A.**, Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C., und Valtieri, M. (2008). Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology* 36, 1035-1046.
- Steadman, J.R.**, Rodkey, W.G., und Briggs, K.K. (2010). Microfracture: Its History and Experience of the Developing Surgeon. *Cartilage* 1, 78-86.
- Steck, E.**, Boeuf, S., Gabler, J., Werth, N., Schnatzer, P., Diederichs, S., und Richter, W. (2012). Regulation of H19 and its encoded microRNA-675 in osteoarthritis and under anabolic and catabolic in vitro conditions. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90, 1185-1195.
- Steele, R.**, Mott, J.L., und Ray, R.B. (2010). MBP-1 upregulates miR-29b that represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes & cancer* 1, 381-387.

- Studer**, D., Millan, C., Ozturk, E., Maniura-Weber, K., und Zenobi-Wong, M. (2012). Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *European cells & materials* 24, 118-135; discussion 135.
- Tallheden**, T., Brittberg, M., Peterson, L., und Lindahl, A. (2006). Human articular chondrocytes--plasticity and differentiation potential. *Cells, tissues, organs* 184, 55-67.
- Tangtrongsup**, S., und **Kisiday**, J.D. (2016). Effects of Dexamethasone Concentration and Timing of Exposure on Chondrogenesis of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cartilage* 7, 92-103.
- Temu**, T.M., Wu, K.Y., Gruppuso, P.A., und Phornphutkul, C. (2010). The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 299, E325-334.
- Torrie**, A.M., Kesler, W.W., Elkin, J., und Gallo, R.A. (2015). Osteochondral allograft. *Current reviews in musculoskeletal medicine* 8, 413-422.
- Tsuchida**, A.I., Beekhuizen, M., t Hart, M.C., Radstake, T.R., Dhert, W.J., Saris, D.B., van Osch, G.J., und Creemers, L.B. (2014). Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis research & therapy* 16, 441.
- Vincent**, K.R., Conrad, B.P., Fregly, B.J., und Vincent, H.K. (2012). The pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* 4, S3-9.
- Vincourt**, J.B., Lionneton, F., Kratassiouk, G., Guillemin, F., Netter, P., Mainard, D., und Magdalou, J. (2006). Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 1984-1995.
- Wachsmuth**, L., Soder, S., Fan, Z., Finger, F., und Aigner, T. (2006). Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histology and histopathology* 21, 477-485.
- Wakitani**, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., und Goldberg, V.M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 76, 579-592.
- Wakitani**, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., und Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 10, 199-206.

- Wei, W.**, He, H.B., Zhang, W.Y., Zhang, H.X., Bai, J.B., Liu, H.Z., Cao, J.H., Chang, K.C., Li, X.Y., und Zhao, S.H. (2013). miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell death & disease* 4, e668.
- Wightman, B.**, Ha, I., und Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Williams, R.**, Khan, I.M., Richardson, K., Nelson, L., McCarthy, H.E., Analbelsi, T., Singhrao, S.K., Dowthwaite, G.P., Jones, R.E., Baird, D.M., *et al.* (2010). Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PloS one* 5, e13246.
- Wilson, R.**, und Bateman, J.F. (2008). A robust method for proteomic characterization of mouse cartilage using solubility-based sequential fractionation and two-dimensional gel electrophoresis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 27, 709-712.
- Wilson, R.**, Belluoccio, D., und Bateman, J.F. (2008). Proteomic analysis of cartilage proteins. *Methods (San Diego, Calif)* 45, 22-31.
- Wilson, R.**, Norris, E.L., Brachvogel, B., Angelucci, C., Zivkovic, S., Gordon, L., Bernardo, B.C., Stermann, J., Sekiguchi, K., Gorman, J.J., *et al.* (2012). Changes in the chondrocyte and extracellular matrix proteome during post-natal mouse cartilage development. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, M111 014159.
- Wojdasiewicz, P.**, Poniatowski, L.A., und Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation* 2014, 561459.
- Woolf, A.D.**, und Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* 81, 646-656.
- Wu, C.**, Tian, B., Qu, X., Liu, F., Tang, T., Qin, A., Zhu, Z., und Dai, K. (2014). MicroRNAs play a role in chondrogenesis and osteoarthritis (review). *International journal of molecular medicine* 34, 13-23.
- Xiong, Y.**, Fang, J.H., Yun, J.P., Yang, J., Zhang, Y., Jia, W.H., und Zhuang, S.M. (2010). Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* 51, 836-845.
- Yang, B.**, Guo, H., Zhang, Y., Chen, L., Ying, D., und Dong, S. (2011). MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9. *PloS one* 6, e21679.
- Yu, Y.**, Wang, Y., Niu, Y., Fu, L., Chin, E., und Yu, C. (2015). Leukemia Inhibitory Factor attenuates renal fibrosis through Stat3-miR-29c. *American journal of physiology Renal physiology* Renal physiology, ajprenal 00634 02014.

Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W., und Huang, D. (2010). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnology letters* 32, 1339-1346.

Zhang, Y., und Zhou, S. (2015). MicroRNA29a inhibits mesenchymal stem cell viability and proliferation by targeting Roundabout 1. *Molecular medicine reports* 12, 6178-6184.

Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., und de Crombrughe, B. (2014). Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS genetics* 10, e1004820.

Zuo, Q., Cui, W., Liu, F., Wang, Q., Chen, Z., und Fan, W. (2013). Co-cultivated mesenchymal stem cells support chondrocytic differentiation of articular chondrocytes. *International orthopaedics* 37, 747-752.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

meiner Doktormutter **Prof. Dr. Susanne Grässel** (Experimentelle Orthopädie, Universitätsklinikum Regensburg) für das interessante Projekt und die gute Betreuung sowie **Prof. Dr. Joachim Grifka** (Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie für die Universität Regensburg im Asklepios Fachkrankenhaus Bad Abbach) für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Orthopädie zu promovieren,

meinen Mentoren **PD Dr. Richard Bauer** (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) und **Prof. Dr. Anja Bosserhoff** (Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Medizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) für die richtungsweisenden Diskussionen bei den Kolloquien,

Prof. Dr. Rainer Straub (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) und **Prof. Dr. Denitsa Docheva** (Experimentelle Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) für den Input bei den Labor-Seminaren und die Mitgliedschaft in der Prüfungskommission,

PD Dr. Jens Schaumburger, **PD Dr. Hans-Robert Springorum** und **PD Dr. Achim Benditz** (Asklepios Fachkrankenhaus Bad Abbach) für das Bereitstellen der OA-Knorpel/Knochenproben und **Nicole Richter** für den Transport in den Biopark sowie **Prof. Dr. Peter Angele** (Sporthopaedicum Regensburg und Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) und **Dr. Karin Benz** (TETEC AG, Reutlingen) für die N-Knorpelproben,

Dr. Thomas Joos und **Dr. Thomas Knorpp** (HOT Screen GmbH, Reutlingen) für die Analyse der Zellkulturüberstände mittels des Luminex-Multiplex-Immunoassays,

dem gesamten Team der experimentellen Orthopädie, besonders **Lilly Weger** und **Mandy Vogel** für die praktische sowie **Dr. Tanja Niedermair** und **Dr. Dominique Muschter** für die fachliche Unterstützung und allen Mitarbeitern des ZMB, besonders **Anja Pasoldt**, **Claudia Göttl**, **Gitta Hauer** und **Daniela Drenkard** für die vielen Tipps,

meinen Eltern **Claudia und Stefan Mayer** und meiner Schwester **Dr. Christine Mayer**, die mich stets unterstützt, zum Durchhalten motiviert und an mich geglaubt haben.

11 Lebenslauf

Ute Mayer

26.08.1985, Alzenau i. Ufr.

Ausbildung

seit 09/2017	Volontariat in der Redaktion von Journal Onkologie und journalmed.de der rs media GmbH, Regensburg
seit 11/2012	Doktorarbeit im Zentrum für medizinische Biotechnologie, Abteilung Experimentelle Orthopädie (Universität Regensburg) unter der Leitung von Prof. Grässel Thema: Interaktion zwischen osteoarthrotischen artikulären Knorpel-/subchondralen Knochenexplantaten und humanen Chondrozyten/mesenchymalen Stammzellen
10/2006 – 02/2012	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg Abschluss: Diplom-Biologin Univ.
02/2011 – 12/2011	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Psychiatrie – Klinische Forschergruppe ADHS (Psychiatrie Würzburg) unter der Leitung von Prof. Lesch Thema: Effects of SLC2A3 duplication – investigation of gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and lymphoblastoid cell lines
10/2005 – 04/2006	Internationale Siedlung der Fokolar-Bewegung in Loppiano/Florenz (Italien); Italienischsprachkurs
09/1996 – 06/2005	Maria-Ward-Gymnasium in Aschaffenburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/1992 – 07/1996	Grundschule in Schöllkrippen

Kongressteilnahmen

2016	Weltkongress der <i>Osteoarthritis Research Society International</i> (OARSI) Amsterdam, Niederlande – Posterpräsentation Reisestipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung
2015	Internationale Konferenz <i>Strategies in Tissue Engineering</i> (SITE) Würzburg – Vortrag
2014, 2015, 2016	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Matrixbiologie (DGMB) Regensburg, Münster, Freiburg – Posterpräsentationen
2014, 2015, 2016	Forschungssymposium Experimentelle Orthopädie Bad Abbach – Vorträge
2014, 2015	Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU) Berlin – Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Mayer U, Benditz A, Grässel S. miR-29b regulates expression of collagens I and III in chondrogenically differentiating BMSC in an osteoarthritic environment. *Sci Rep* 2017; 7(1):13297.

Merker S, Reif A, Ziegler GC, Weber H, Mayer U, Ehlis AC, Conzelmann A, Johansson S, Müller-Reible C, Nanda I, Haaf T, Ullmann R, Romanos M, Fallgatter AJ, Pauli P, Strekalova T, Jansch C, Vasquez AA, Haavik J, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Buitelaar JK, Franke B, Lesch KP. SLC2A3 single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 2017; 58(7):798-809.

Gutknecht L, Araragi N, Merker S, Waider J, Sommerlandt FM, Mlinar B, Baccini G, Mayer U, Proft F, Hamon M, Schmitt AG, Corradetti R, Lanfumey L, Lesch KP. Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One* 2012; 7(8):e43157.

12 Selbständigkeitserklärung

“Ich, Ute Mayer, geboren am 26.08.1985 in Alzenau i. Ufr., erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift
des Promovenden